

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

LILIANNE MARTINS RIBEIRO

Caracterização molecular de isolados de *Pratylenchus brachyurus* e aspectos do parasitismo em milho e soja

Maringá
2016

LILIANNE MARTINS RIBEIRO

Caracterização molecular de isolados de *Pratylenchus brachyurus* e aspectos do parasitismo em milho e soja

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia

Área de concentração: Proteção de Plantas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Regina Dias-Arieira.

Maringá
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

R484c Ribeiro, Lilianne Martins
Caracterização molecular de isolados de *Pratylenchus brachyurus* e aspectos do parasitismo em milho e soja / Lilianne Martins Ribeiro. -- Maringá, 2016.
Xii, 70 f. : il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Cláudia Regina Dias-Arieira.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2016.

1. *Pratylenchus brachyurus* - Isolados - Caracterização molecular. 2. *Pratylenchus brachyurus* - Agressividade - Nematóide das lesões radiculares. 3. *Zea Mays* - Região D2/D3 - *Glycine max*. 4. *Zea Mays* - Região ITS. I. Dias-Arieira, Cláudia Regina, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDD 21.ed.633.15


LILIANNE MARTINS RIBEIRO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Pratylenchus brachyurus* E ASPECTOS DO PARASITISMO EM MILHO E SOJA

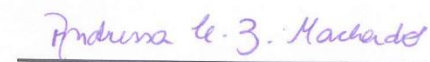
Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, na Área de Concentração em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2016.

Prof^a. Dr^a. **Cláudia Regina Dias Arieira**
Presidente



Prof^a. Dr^a. **Andressa Cristina Zamboni Machado**
Membro



Prof^a. Dr^a. **Débora Cristina Santiago**
Membro



Prof^a. Dr^a. **Kátia Regina Freitas Schwan Estrada**
Membro



Prof. Dr. **William Mário de Carvalho Nunes**
Membro



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Antônio Carlos e Suely Ribeiro, que não mediram esforços na contribuição para sua realização.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, obrigada por guiar meus passos e iluminar meu caminho, me dando força e sabedoria.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia e a seus professores, por fazerem possível a concretização desta etapa educacional.

À CAPES - Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior, pela oportunidade de realizar parte do doutorado nos Estados Unidos.

Ao CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de estudos.

À minha família, por estar comigo durante todo período do doutorado.

À professora Cláudia Regina Dias-Arieira, pela amizade e colaboração na minha formação, me proporcionando conhecimento.

Aos professores Dauri José Tessmann, Kátia R. F. Schwan-Estrada e William M. C. Nunes por me cederem sempre um lugar em seus laboratórios.

Aos amigos da secretaria (Reinaldo e Érika), Laboratório de Nematologia (principalmente Heriksen, Vinícius e Mayra), Laboratório de Fitopatologia - família T33/3^a Idade da Fito e agregados (A. Jussiê, Carol Bertuzzi, Chile, Clei, Danilo, Jéssica, Ju, Mari e Virlene), obrigada pela amizade, confiança e momentos de descontração.

Enfim, a todos aquele que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho, **MUITO OBRIGADA!**

Caracterização molecular de isolados de *Pratylenchus brachyurus* e aspectos do parasitismo em milho e soja

RESUMO GERAL

Pratylenchus brachyurus é um dos fitonematoides mais disseminados no país, comprometendo a produtividade de diversas culturas, como o milho e a soja. Sua patogenicidade, entretanto, é pouco estudada. Os objetivos deste trabalho foram: i) caracterizar filogeneticamente 14 isolados de *P. brachyurus* de quatro regiões geográficas do Brasil, baseado em segmentos de expansão D2/D3 do gene 28S e da região 18S-ITS1-5.8S do rDNA; ii) comparar a reprodução *in vivo* e a patogenicidade de 19 populações de *P. brachyurus* provenientes de diferentes regiões geográficas do Brasil nas culturas do milho e da soja e, observar possíveis diferenças comportamentais entre as populações; e iii) avaliar a mortalidade e capacidade infectiva de espécimes sobreviventes do nematoide *P. brachyurus* em solo infestado artificialmente e observar os efeitos da dessecação sobre o nematoide. O sequenciamento das regiões D2/D3-28S e 18S-ITS1-5.8S do rDNA revelaram variação nucleotídica entre os diferentes isolados de *P. brachyurus* independente da origem geográfica, as quais foram de 2,6% e 8,7%, respectivamente. O estudo filogenético confirmou a variabilidade observada. A região D2/D3-28S não mostrou clara separação dos isolados brasileiros. No entanto, as sequências da região 18S-ITS1-5.8S do rDNA mostraram-se como importante ferramenta na identificação de *Pratylenchus* spp. Na análise reprodutiva de *P. brachyurus*, as populações Pb-BJe e Pb-16 do estado de Goiás foram mais agressivas à cultura do milho e da soja, respectivamente. Os experimentos de mortalidade e capacidade infectiva do nematoide sugeriram que, independente da cultura hospedeira, *P. brachyurus* é capaz de permanecer no solo durante o período da dessecação e infectar as raízes do hospedeiro. O método de inoculação com fragmentos de raízes infectadas apresentou menor mortalidade e maior penetração de indivíduos. Efeitos da dessecação foram observados aos 90 e 120 dias em nematoides anidrobióticos.

Palavras-chave: Agressividade. Região D2/D3. *Glycine max*. Região ITS. Nematóide das lesões radiculares. *Zea mays*.

Molecular characterization of *Pratylenchus brachyurus* isolates and aspects of parasitism in maize and soybeans

ABSTRACT

Pratylenchus brachyurus is one of the most widespread plant-parasitic nematodes in Brazil, jeopardizing the productivity of various crops such as maize and soybean. Pathogenicity, therefore, is scarce. The objectives of this work were: i) to characterize phylogenetically 14 isolates of *P. brachyurus* from four geographic regions of Brazil, based on based on D2/D3 expansion segments of 28S gene of rDNA and 18S-ITS1-5.8S rDNA regions; ii) to compare the *in vivo* reproduction and pathogenicity of 19 populations of the *P. brachyurus* from different regions of Brazil, in maize and soybeans, and observe possible behavioral differences among populations; and iii) to evaluate the mortality and infective capacity of the nematode *P. brachyurus* in artificially infested soil and the effects of desiccation on the nematode. The sequencing of D3/D2-28S and 18S-ITS1-5.8S rDNA regions revealed nucleotidic variation among different isolates of *P. brachyurus* independent of geographical origin, which were 2.0% by and 8.7%, respectively. The phylogenetic study confirmed the variability observed. The D2/D3-28S region showed no clear separation of the Brazilian isolates. However, the sequences of 18S-ITS1-5.8S region showed to be an important tool on identification of *Pratylenchus* spp. In the reproductive analysis of the nematode, the Pb-PBJe and Pb-16 populations of Goiás state were more aggressive on the maize and soybeans, respectively. The analysis of mortality experiments and infective capacity of the nematode suggested that, independently of the host plant, *P. brachyurus* is able to remain on the soil during the period of desiccation and infect roots of the host. The inoculation method with fragments of infected roots showed lower mortality and higher penetration of individuals. Desiccation effects were observed at 90 and 120 days in nematodes anhydrobiotics.

Keywords: Aggressiveness. D2/D3 region. *Glycine max*. ITS region. Root lesion nematode. *Zea mays*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1. Gel de agarose a 1% com fragmentos específicos dos diferentes isolados de *P. brachyurus* do Brasil. M = marcador molecular de 250pb (GeneRuler) Códigos dos isolados de *P. brachyurus* são apresentados na Figura 1. A) 18S e ACM7R primers: -C= controle negativo (água); C1 e C2= controle positivo (*P. scribneri* e *P. penetrans*); B) D2A-D3B primers; C) 18S e RN58SR primers..... 15
- Figura 2. Matriz de valores de similaridade (%) das sequências dos isolados de *Pratylenchus brachyurus* do rDNA. Acima dos traços (-) segmentos de expansão D2-D3 parcial 28S e abaixo dos traços (-) região ITS-1..... 16
- Figura 3. Prettyplot múltiplo alinhamento das sequências de diferentes isolados de *Pratylenchus brachyurus* do Brasil e do banco de dados GenBank. Seção A representa as sequências nucleotídicas no segmento de expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA. Seção B representa região 18S-ITS1-5.8s do rDNA..... 19
- Figura 4. Filograma da relação filogenética de *Pratylenchus brachyurus* baseado no alinhamento das sequências do seguimento de expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA. Árvore gerada utilizando Neighbor-joining (NJ). Valores de *bootstrap* a partir de 1000 repetições são mostrados nos nós das árvores. A análise de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean gerou mesma topologia (dados não apresentados)..... 20
- Figura 5. Filograma da relação filogenética de *Pratylenchus brachyurus* baseado no alinhamento das sequências da região 18S-ITS1-5.8s do rDNA. Árvore gerada utilizando Neighbor-joining (NJ). Valores de *bootstrap* a partir de 1000 repetições são mostrados nos nós das árvores. A análise de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean gerou mesma topologia (dados não apresentados)..... 21
- Figura 6. Filograma da relação filogenética de *Pratylenchus brachyurus* baseado no alinhamento de curtas sequências da região ITS1 do rDNA. Árvore gerada utilizando Neighbor-joining (NJ). Valores de *bootstrap* a partir de 1000 repetições são mostrados nos nós das árvores. A análise de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean gerou mesma topologia (dados não apresentados)..... 22

CAPÍTULO 3

- Figura 1. Gráfico box-plot para a mortalidade de espécimes de *P. brachyurus*. A- Mortalidade do nematoide por tratamento; B- Mortalidade do nematoide por tipo de inoculação; C- Mortalidade do nematoide durante o período de dessecação..... 61
- Figura 2. Gráfico box-plot para a penetração de espécimes de *P. brachyurus*. A- Penetração do nematoide por tratamento; B- Penetração do nematoide por tipo de inoculação; C- Penetração do nematoide durante o período de dessecação..... 62

Figura 3. Formatos de juvenis de *P. brachyurus* extraídos a partir do solo dessecado aos 90 e 120 dias. A e B) C aberto; C e D) Enrolado; E) C fechado; F) Região posterior enrolada..... 63

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.	Origem dos isolados brasileiros de <i>Pratylenchus brachyurus</i>	11
-----------	---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1.	Origem das 19 populações de <i>Pratylenchus brachyurus</i> utilizadas no presente estudo.....	35
Tabela 2.	Massa seca da parte aérea (MSPA) e massa fresca das raízes (MFR) de milho cv. A1 Bandeirantes e soja cv. NA7337 aos 60 dias após a inoculação com 2000 espécimes de diferentes populações de <i>Pratylenchus brachyurus</i>	39
Tabela 3.	Efeito sobre o número total de nematoides recuperados por sistema radicular (NSR), número de nematoides por grama de raiz (NGR) e fator de reprodução (FR) de <i>Pratylenchus brachyurus</i> em cultivares de milho e soja aos 60 dias após a inoculação.....	41

CAPÍTULO 3

Tabela 1.	Média, variância, mínimo (Min) e máximo (Max) das variáveis resposta: mortalidade e penetração por nível categórico (tratamentos e inoculação) e preditor quantitativo (tempo).....	55
Tabela 2.	“Goodness-of-fit” dos modelos estatísticos binomial negativo (BN) e Poisson para mortalidade e distribuição de Poisson e Poisson Inflacionado de Zero (ZIP) para os modelos de comparação para penetração de <i>Pratylenchus brachyurus</i>	56
Tabela 3.	Critérios de seleção do modelo preferido para mortalidade e penetração de <i>Pratylenchus brachyurus</i>	56
Tabela 4.	Análise tipo III dos efeitos principais e interações do modelo linear generalizado para o conjunto de dados da mortalidade e penetração de <i>Pratylenchus brachyurus</i>	59
Tabela 5.	Diferenças estimadas através do método da média dos mínimos quadrados (LSM) para mortalidade e penetração de <i>Pratylenchus brachyurus</i>	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REFERÊNCIAS	4
CAPÍTULO 1	
Caracterização filogenética entre isolados de <i>Pratylenchus brachyurus</i> do Brasil com base em análise das sequências do segmento de expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA e da região 18S-ITS1-5.8S do rDNA	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.1 Obtenção dos isolados.....	11
2.2 Extração de DNA.....	11
2.3 Amplificação e análise do produto de PCR	12
2.4 Clonagem e sequenciamento.....	13
2.5 Alinhamento das sequências e análise filogenética	14
3 RESULTADOS	15
3.1 Identificação e caracterização das sequências dos isolados de <i>P. brachyurus</i>	15
3.2 Alinhamento múltiplo das sequências e análise filogenética	16
4 DISCUSSÃO	23
5 CONCLUSÃO.....	25
6 REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 2	
Capacidade reprodutiva de populações de <i>Pratylenchus brachyurus</i> em milho e soja	30
RESUMO.....	31
ABSTRACT	32
1 INTRODUÇÃO.....	33
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1 Arranjo experimental e obtenção das populações.....	35
2.2 Preparo do inóculo e inoculação	36
2.3 Avaliações	36

2.4 Análise dos dados	37
3 RESULTADOS	38
4 DISCUSSÃO	42
5 CONCLUSÃO	44
6 REFERÊNCIAS	45
CAPÍTULO 3	
Mortalidade de <i>Pratylenchus brachyurus</i> durante estresse da dessecação e capacidade infectiva de espécimes sobreviventes em milho e soja pós dessecação	48
RESUMO.....	49
ABSTRACT	50
1 INTRODUÇÃO.....	51
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1 Delineamento experimental	53
2.2 Preparo do inóculo e inoculação	53
2.3 Análise dos dados	54
3 RESULTADOS	59
3.1 Nematoides remanescente e infectividade	59
3.2 Efeitos da dessecação.....	63
4 DISCUSSÃO	64
5 CONCLUSÃO.....	67
6 REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO GERAL

O milho (*Zea mays*) e a soja (*Glycine max*), atualmente, são as culturas agrícolas mais importantes no Brasil, ocupando uma área de 48 milhões de hectares (CONAB, 2015). A região Centro-Sul é a de maior destaque na produção, responsável por 40 milhões dos hectares cultivados no país (CONAB, 2015). Entretanto, o modelo de produção agrícola passa por desafios que limitam o alto rendimento, entre eles as doenças de plantas.

Nematoides fitoparasitas estão entre os quatro maiores grupos de patógenos causadores de doenças de plantas em termos de perdas econômicas na agricultura. Em geral, são organismos difíceis de estudar por serem parasitas biotróficos, sendo que a maioria está presente no solo e infecta as raízes das plantas (JONES; FOSU-NYARKO, 2014).

O gênero *Pratylenchus* é o mais cosmopolita em termos da diversidade de habitats ocupados. De acordo com estudos taxonômicos e moleculares, já são conhecidas e descritas mais de 89 espécies (CASTILLO; VOVLAS, 2007; INSERRA et al., 2007; MIZUKUBO et al., 2007; SUBBOTIN et al., 2008; TROCCOLI et al., 2008 e PALOMARES-RIUS et al., 2010). Nematoides deste gênero foram descritos parasitando importantes culturas, incluindo cereais (arroz, milho e trigo), algodão, batata, café, cana de açúcar, culturas forrageiras, a maioria das frutíferas e olerícolas (JONES; FOSU-NYARKO, 2014).

Algumas espécies do gênero têm ampla distribuição geográfica, geralmente, associada à existência de plantas hospedeiras que suportem sua reprodução, sendo de ocorrência relatada especialmente em regiões tropicais e subtropicais (CASTILLO; VOVLAS, 2007). No Brasil, a espécie *P. brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & Stekhoven, 1941 tem mostrado grande importância nas principais regiões produtoras do país. Na região central do Brasil, é o nematoide mais distribuído (SILVA et al., 2004; ALVES et al., 2011), sendo descrito frequentemente em lavouras de soja comerciais da região. Têm sido relatadas perdas de 30 a 50% na produção de soja por este nematoide no Distrito Federal, Goiás e Bahia (GOULART, 2008). Populações do nematoide têm ocorrido, principalmente, em áreas de monocultivo de soja ou em sistemas de sucessão e/ou rotação com culturas que são boas hospedeiras, como o milho. Tal relevância está associada a algumas características apresentadas por esse nematoide. Devido à raridade de machos, a partenogênese é o modo de reprodução em cerca da metade das espécies conhecidas de *Pratylenchus*. Em populações de *P. brachyurus*, os machos são raros, assim, as populações são quase que exclusivamente constituídas por fêmeas

e juvenis. As fêmeas depositam seus ovos isoladamente, no solo ou no interior das raízes parasitadas, sendo mais comum no interior de tecidos parasitados. Assim que os juvenis de segundo estágio (J2) eclodem dos ovos, iniciam imediatamente o parasitismo (FERRAZ, 2006). A duração do ciclo de vida varia com as diferentes espécies e em função de fatores do ambiente, variando de três a quatro semanas (CASTILLO; VOVLAS, 2007).

A penetração e migração nas raízes do hospedeiro são facilitadas pela combinação da força do estilete e a liberação de substâncias enzimáticas nas paredes das células (FERRAZ, 2006). Embora nematoides deste gênero, também, possam ser encontrados parasitando externamente seus hospedeiros, os maiores danos estão ligados à sua atividade no interior do tecido radicular, assumindo hábito migratório de alimentação. A vasta gama de hospedeiros sugere que o parasitismo seja pouco especializado, não havendo necessidade de formação de nenhuma célula especializada de alimentação, como ocorre com os nematoides de cisto (*Heterodera glycines*) e de galhas (*Meloidogyne* spp.). Neste caso, portanto, as chances de se encontrar fontes de resistência são menores (DIAS et al., 2010).

Para sobreviver no solo, os nematoides têm que ser capazes de contornar fatores bióticos e abióticos (como predadores, mudanças na temperatura do solo, umidade, pH e morte da planta hospedeira), além de associar estratégias de sobrevivência comportamentais e fisiológicas. Possuem cutícula fina, pois vivem, na maioria das vezes, no interior de tecidos vegetais, onde encontram proteção em relação a alguns predadores (CASTILLO; VOVLAS, 2007). No Brasil, a sobrevivência de *P. brachyurus* está diretamente relacionada ao manejo do solo. O sistema de plantio adotado pode ser um dos fatores que contribuem para os nematoides encontrarem condições de umidade e temperatura ideais para sua reprodução e alimentação, garantindo sua sobrevivência. No caso da soja, a sobrevivência de *P. brachyurus* depende da existência de raízes no campo durante o período mais crítico, que é entre a colheita e o próximo plantio da cultura (INOMOTO, 2008).

A importância do nematoide das lesões na cultura da soja era relativamente pequena antes da popularização do plantio direto, onde há maior disponibilidade de alimento para o nematoide, pois as culturas de cobertura utilizadas para formar palhada asseguram no solo a manutenção do teor de umidade adequado à sobrevivência e boa atividade dos nematoides durante boa parte do ano (TORRES et al., 2008).

Com efeito, as condições encontradas no Brasil favoreceram *P. brachyurus*, que se tornou uma espécie muito agressiva à soja. Muitas vezes sua patogenicidade é baseada em observações feitas a campo, desprovida de estudos aprofundados que avaliem adequadamente a

interação do nematoide e o seu hospedeiro. A introdução de resistência em cultivares brasileiras comerciais de soja pelo melhoramento convencional tem aplicação limitada (FERRAZ, 2006; INOMOTO; SILVA, 2011), pelos altos níveis de variabilidade genética dentro e entre as populações do nematoide. Além disso, poucos estudos de investigação têm demonstrado a capacidade de permanência do nematoide em fragmentos radiculares e no solo após longo período sem umidade.

Considerando os comentários anteriores e as hipóteses de que: (i) Isolados de *P. brachyurus* de diferentes origens geográficas apresentam variabilidade intraespecífica e diferenças comportamentais em relação ao hospedeiro; (ii) *P. brachyurus* é capaz de permanecer no solo com ou sem a presença de hospedeiro durante longo período podendo resistir a dessecação; e objetivando embasar o desenvolvimento de cultivares comerciais resistentes ou tolerantes ao nematoide e auxiliar em estratégias de controle, esta tese foi organizada em três capítulos: O primeiro capítulo é uma descrição da caracterização filogenética entre isolados de *P. brachyurus* de diferentes regiões geográficas do Brasil com base nas sequências do segmento de expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA e da região 18S-ITS1-5.8s do rDNA. No capítulo seguinte, 19 populações de *P. brachyurus* do Brasil foram avaliadas em relação à aptidão reprodutiva e patogenicidade em cultivares suscetíveis de milho e soja. No capítulo 3 é caracterizada a capacidade de permanência de *P. brachyurus* em raízes e no solo após longo período de dessecação.

2. REFERÊNCIAS

- ALVES, T. C. U.; SILVA, R. A.; BORGES, D. C.; MOTTA, L. C. C.; KOBAYASTI, L. Reação de cultivares de soja ao nematoide das lesões radiculares *Pratylenchus brachyurus*. **Revista Biodiversidade**, v. 10, p. 73-79, 2011.
- CASTILLO, P.; VOVLAS, N. *Pratylenchus* (Nematoda: *Pratylenchidae*): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management. **Nematology Monographs and Perspectives**, v. 6, 2007. 529p.
- CONAB. Companhia Nacional de abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**, v. 3- Safra 2015/16 - Terceiro levantamento, Brasília, p. 1-152, dezembro 2015. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 20/11/2015.
- DIAS, W. P.; GARCIA, A.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. E. de S. **Nematoides em soja: identificação e controle**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 8 p. (Circular Técnica 76).
- FERRAZ, L. C. C. B. O nematoide *Pratylenchus brachyurus* e a soja sob plantio direto. **Revista Plantio Direto**, v. 96, p. 23-27, 2006.
- GOULART, A. M. C. **Aspectos gerais sobre nematoides das lesões radiculares (Gênero *Pratylenchus*)**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. 30 p. (Documentos 219).
- INOMOTO, M. M. Importância e manejo de *Pratylenchus brachyurus*. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, 8 ed., nov./dez. 2008. Disponível em: <<http://www.plantiodireto.com.br>>. Acesso em: 20/12/2015.
- INOMOTO, M. M.; SILVA, R. A. **Importância dos nematoides da soja e influência da sucessão de cultura**. Boletim de Pesquisa de Soja, Rondonópolis, n. 15, p. 392-399, 2011.
- INSERRA, R. N.; TROCCOLI, A.; GOZEL, U.; BERNARD, E. C.; DUNN, D.; DUNCAN, L. W. *Pratylenchus hippeastri* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae) from amaryllis in Florida with notes on *P. scribneri* and *P. hexincisus*. **Nematology**, v. 9, p. 25-42, 2007.
- JONES, M. G. K.; FOSU-NYARKO, J. Molecular biology of root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) and their interaction with host plants. **Annals of Applied Biology**, v. 164, p.163-181, 2014.
- MIZUKUBO, T.; SUGIMURA, K.; UESUGI, K. A new species of the genus *Pratylenchus* from chrysanthemum in Kyushu, western Japan (Nematoda: Pratylenchidae). **Japanese Journal of Nematology**, v. 37, p. 63-74, 2007.

PALOMARES-RIUS, J. E.; LANDA, B. B.; TANHA MAAFI, Z.; HUNT, D. J., CASTILLO P. Comparative morphometrics and ribosomal DNA sequence analysis of *Longidorus orientalis* Loof, 1983 (Nematoda:Longidoridae) from Spain and Iran. **Nematology**, v. 12, p. 631-640, 2010.

SILVA, R. A.; SERRANO, M. A. S.; GOMES, A. C.; BORGES, D. C.; SOUZA, A. A.; ASMUS, G. L.; INOMOTO, M. M. Ocorrência de *Pratylenchus brachyuruse Meloidogyne incognita* na cultura do algodoeiro no Estado do Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, 337-337, 2004.

SUBBOTIN, S. A.; RAGSDALE, E. J.; MULLENS, T.; ROBERTS, P. A.; MUNDO-OCAMPO, M.; BALDWIN, J. G. A phylogenetic framework for root lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda): Evidence from 18S and D2–D3 expansion segments of 28S ribosomal RNA genes and morphological characters. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, p. 491-505, 2008.

TORRES, R. G.; RIBEIRO, N. R.; BOER, C. A.; FERNANDES, O.; FIGUEIREDO, A. G.; FERREIRA NETO, A. **Manejo integrado de nematoides em sistema de plantio direto no cerrado**. Embrapa, 2008. 23p. (EMBRAPA, Boletim Técnico.)

TROCCOLI, A.; DE LUCA, F.; HANDOO, Z. A.; DI VITO, M. Morphological and molecular characterization of *Pratylenchus lentis* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae) from Sicily. **Journal of Nematology**, v. 40, p. 190-196, 2008.

CAPÍTULO 1

Caracterização filogenética entre isolados de *Pratylenchus brachyurus* do Brasil com base em análise das sequências do segmento de expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA e da região 18S-ITS1-5.8S do rDNA

Caracterização filogenética entre isolados de *Pratylenchus brachyurus* do Brasil com base em análise das sequências do segmento de expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA e da região 18S-ITS1-5.8S do rDNA

RESUMO

Os nematoides das lesões, *Pratylenchus* spp. causam grande impacto econômico em culturas em todo o mundo, ocupando o terceiro lugar, atrás dos nematoides de galhas e cisto em termos de danos e perdas nas culturas. Neste estudo foi realizada a caracterização filogenética de 14 isolados de *P. brachyurus* de quatro regiões geográficas do Brasil com base em segmentos de expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA e da região 18S-ITS1-5.8S do rDNA. As sequências foram alinhadas e analisadas por meio dos métodos de distância UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) e NJ (Neighbor-joining), afim de, inferir as relações filogenéticas entre os isolados. A análise comparativa das sequências de nucleotídeos dos genes revelou a existência de níveis substanciais de variação nucleotídica intraespecífica dentro dos isolados, independentes da origem geográfica, variando de até 2,0% nas sequências da região D2/D3-28S e na região 18S-ITS1-5.8S do rDNA variou até 8,7%. O estudo filogenético baseado na região D2/D3-28S não mostrou clara separação dos isolados brasileiros, quando comparado as sequências de isolados de *P. brachyurus* depositados em banco de dados. O sequenciamento e análise filogenética com base nas sequências da região 28S-ITS1-5.8s do rDNA demonstraram que essa região é uma importante ferramenta na identificação de *P. brachyurus*, além de poder ser um marcador molecular para inferir relações filogenéticas.

Palavras-chave: Complexo de espécies. Filogenia. Máxima parcimônia. Nematóide das lesões radiculares.

Phylogenetic characterization among different *Pratylenchus brachyurus* isolates from Brazil based on sequence analysis of expansion segment D2/D3 of 28S gene and 18S-ITS1-5.8S rDNA region

ABSTRACT

The lesion nematodes, *Pratylenchus* spp., cause great economic impact in crops worldwide, ranking third behind root knot and cyst nematodes in terms of crop damage and loss. In this study we performed molecular characterization of 14 isolates of *P. brachyurus* from four geographical regions in Brazil based on D2/D3 extension segment of 28S gene and 18S-ITS1-5.8S rDNA regions. The sequences were aligned and analyzed by means of Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) as well as Neighbor-joining (NJ) to infer phylogenetic relationships between the isolates. Comparative analysis of nucleotide sequences of genes revealed the existence of substantial levels of intraspecific variation within the isolates independent of geographical origin of the isolates, ranging until 2.0% in D2/D3-28S region, while, the 18S-ITS1-5.8S region ranged until 8,7%. The phylogenetic study based on D2/D3-28S region did not show clear separation of Brazilian, when compared with *P. brachyurus* sequences from the database. The sequencing and phylogenetic analysis based on the sequences of 18S-ITS1-5.8s region demonstrated as important tool to identification of *P. brachyurus*, as well, a molecular marker to study filogenetic.

Keywords: Species complex. Phylogeny. Maximum parsimony. Root lesion nematode.

1. INTRODUÇÃO

Nematoides parasitas de plantas são de grande importância econômica na agricultura, causando perdas na safra mundial estimadas em 80 bilhões de dólares por ano (NICOL et al., 2012). Os nematoides das lesões radiculares, *Pratylenchus* Filipjev, 1936 ocupam a terceira posição em termos de danos e perdas nas culturas (CASTILLO; VOVLAS, 2007). O impacto econômico de *Pratylenchus* spp. é devido à sua capacidade de parasitar uma vasta gama de plantas hospedeiras, incluindo culturas agronomicamente importantes (por exemplo, milho, trigo, arroz, legumes, batata, cana de açúcar, algodão), plantas ornamentais, bem como muitas árvores frutíferas e castanheiras, e também sua capacidade de se adaptar a quase todos os tipos de condições ambientais (CASTILLO; VOVLAS, 2007). Nematoides das lesões migram dentro do tecido cortical das raízes causando redução no crescimento radicular acompanhado pela formação de lesões, áreas necróticas, escurecimento e morte celular (JONES; FOSU-NYARKO, 2014).

Pratylenchus brachyurus (Godfrey, 1929) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 é amplamente distribuído nas regiões tropicais do mundo, causando danos significativos à culturas economicamente importantes, tais como milho, algodão, amendoim e soja (CASTILLO; VOVLAS, 2007). No Brasil, a incidência de *P. brachyurus* atingiu 96% dos solos cultivados com soja, superior a outros importantes nematoides da cultura, como *Meloidogyne* Goeldi, 1887 e *Heterodera* Schmidt, 1871 (SILVA et al., 2004). A melhor maneira de controlar os danos causados por *P. brachyurus* seria através da rotação de culturas com cultivares não hospedeiras ou resistentes (GOULART, 2008), mas estudos a respeito da reação das cultivares de soja demonstraram a ausência de materiais resistentes ou tolerantes (ALVES et al., 2011).

Além disso, a variação intraespecífica entre isolados de *P. brachyurus* (TARJAN; FEDERICK, 1978; PAYAN; DICKSON, 1990, MACHADO et al., 2015) causa um problema adicional na aplicação de estratégias de manejo bem-sucedidas. Variações genéticas e preferências por diferentes hospedeiros entre isolados de *P. brachyurus* confirmam que podem existir diferentes raças fisiológicas nesta espécie (PAYAN; DICKSON, 1990). Assim, é possível que espécies crípticas (morfologicamente indistinguíveis, mas geneticamente divergentes) podem existir neste táxon formando um complexo de espécies, como relatado para *P. coffeae* (Zimmermann, 1898) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 (DUNCAN et al., 1999; MIZUKUBO et al., 2003; DE LUCA et al., 2012).

Durante vários anos, a análise do gênero *Pratylenchus* foi baseada apenas na morfologia e morfometria das espécies. No entanto, a natureza microscópica destes nematoides gerou problemas de similaridade aparente na identificação morfológica (SUBBOTIN et al., 2008).

Novas abordagens baseadas na análise bioquímica, molecular e filogenética têm fornecido ferramentas úteis para discriminar diferenças entre diferentes isolados e espécies de *Pratylenchus* (ABEBE et al., 2011). A caracterização molecular baseada no DNA ribossomal (rDNA) (POWERS, 2004) tem sido amplamente utilizada para identificar a variação genética a nível de espécie. Cada repetição do DNA consiste de unidades transcritas (pequena subunidade (SSU) ou 18S; grande subunidade (LSU) ou 28S; 5.8S; espaçadores transcritos internos e externos) e um externo não transcrito ou espaçador intergênico (HAJIEGHRARI et al., 2007). A LSU contém regiões altamente variáveis denominadas como domínios divergentes (D) ou segmentos de expansão D2 e D3 subunidade 28S do rDNA (D2-D3 LSU-rDNA) (SUBBOTIN et al., 2005). O sequenciamento da região D2-D3 LSU-rDNA tem sido largamente utilizado para confirmar a relação intra e interespecífica de diferentes isolados e espécies de *Pratylenchus* (MACHADO et al., 2015). No entanto, vários autores argumentaram que os segmentos de expansão D2-D3 podem não ser adequados para resolver as relações entre nematoides do gênero *Pratylenchus* em nível de espécie por causa da existência de espécies crípticas ou complexo de espécies (AL-BANNA et al., 1997; DUNCAN et al., 1999; DE LUCA et al., 2004; SUBBOTIN et al., 2008).

Estudos recentes utilizando a região ITS do rDNA demonstraram a utilidade dessa abordagem para a identificação e reconstrução filogenética dentro do gênero *Pratylenchus* (WAEYENBERGE et al., 2009; PALOMARES-RIUS et al., 2010; DE LUCA et al., 2011; MACHADO et al., 2015). A região ITS é um dos loci nuclear mais variável até agora identificados em *Pratylenchus* spp. (WAEYENBERGE et al., 2000). A pequena subunidade ribossomal (18S gene) é a mais amplamente utilizada como marcador molecular para a análise filogenética, especialmente para avaliar as relações filogenéticas entre organismos, incluindo nematoides (DE LUCA et al., 2011). No entanto, informações a respeito da relação filogenética em *Pratylenchus brachyurus* no Brasil são escassas. Neste sentido os objetivos deste estudo foram: i) confirmar a espécie dos 14 isolados de *Pratylenchus* a partir de sequências de segmento de expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA e da região 18S-ITS1-5.8S do rDNA; ii) caracterizar a relação filogenética dos isolados de *Pratylenchus* spp.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados

Os 14 isolados foram obtidos a partir de raízes de soja coletadas nos Estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso e Paraná (Figura 1). Estes isolados foram preliminarmente identificados com base em caracteres morfológicos como *P. brachyurus* (HANDOO; GOLDEN, 1989) e mantidos em plantas de soja (cv. NA7337) em casa de vegetação.

Tabela 1. Origem dos isolados brasileiros de *Pratylenchus brachyurus*.

Isolado	Origem geográfica
Pb-SDe	São Desidério – Bahia
Pb-SDe1	São Desidério – Bahia
Pb-Ac	Acreúna – Goiás
Pb-BJe	Bom Jesus – Goiás
Pb-Go	Goiatuba – Goiás
Pb-Jat	Jataí – Goiás
Pb-Mon	Montividiu – Goiás
Pb-Qui	Quirinópolis – Goiás
Pb-Rv	Rio Verde – Goiás
Pb-Rv1	Rio Verde – Goiás
Pb-Ca	Canarana – Mato Grosso
Pb-Pva	Primavera do Leste – Mato Grosso
Pb-Cm	Campo Mourão – Paraná
Pb-Tun	Tuneiras do Oeste – Paraná

2.2 Extração de DNA

Isolados de *P. brachyurus* do Brasil foram extraídos a partir de raízes de soja de acordo com a metodologia de Coolen e D'Herde (1972). Cerca de 20 indivíduos de cada amostra foram cuidadosamente selecionados e transferidos para uma solução contendo EDTA dissódico 0,25 M (pH 8,0) e DMSO 20% (dimetil sulfóxido), saturado com NaCl 5 M

(SEUTIN et al., 1991) em microtubos de 1,5 ml. Os espécimes foram enviados para a University of Florida – Nematology Assay Lab, e depois da recepção foram colocados sob condição de temperatura ambiente até serem utilizados para extração do DNA.

O DNA foi extraído a partir de único juvenil pelo método de digestão de NaOH (FLOYD et al., 2002). Resumidamente, os nematoides foram colocados individualmente em microtubos contendo 20 µl de solução de NaOH a 0,25 M e incubados durante a noite à 25°C. Em seguida, os microtubos foram aquecidos a 99 °C durante 3 min e arrefecidos à temperatura ambiente (25 °C). Logo após esse período, foram adicionados 5 µl de HCl 1M, 10 µl de Tris-HCl 0,5 M (pH 8,0) e 5 µl de Triton X-100 2%. Os microtubos foram misturados cuidadosamente e aquecidos a 99 °C durante 3 min.

2.3 Amplificação e análise do produto de PCR

Antes de prosseguir o trabalho molecular, cada isolado foi identificado e confirmado como *P. brachyurus* utilizando o primer 18S 5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3' e primer específico ACM7R 5'- GCWCCATCCAAACAAYGAG -3' (MACHADO et al., 2007). A mistura de 25 µl da reação de PCR continha 0,5 µl de DNA extraído, 1 µl de cada primer (10 µM), 10 µl H₂O e 12,5 µl de 2 X Taq Hot Start Master Mix (New England, BioLabs), um controle negativo (sem DNA) e dois controles adicionais com DNA de *P. scribneri* Steiner, 1943 e *P. penetrans* (Cobb, 1917) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 foram também incluídos. O programa de amplificação iniciou em 95 °C por 15 min, seguido de 30 ciclos: desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 50 °C por 45 segundos, extensão a 72 °C por 2 min; e completado por um ciclo a 72 °C por 10 min em Mastercycler Nexus Thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg). Para região 18S-ITS1-5.8S do rDNA, utilizou-se os primers 18S 5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3 e RN58SR 5'-ACGAGCCGAGTGATCCACCG-3' (MACHADO et al., 2007). As condições de amplificação foram às seguintes: 94 °C por 2 min e 45 segundos seguidos por 40 ciclos a 94 °C por 1 min, 57 °C por 45 segundos, 72 °C por 2 min e a extensão final de 72 °C por 10 min. Para amplificar os segmentos de expansão do regioao D2/D3-28S do rDNA (750bp), a PCR foi realizada utilizando os primers D2A 5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3' e D3B 5'-CGGAAGGAACCAGCTACTA-3' (HAJIEGHRARI et al., 2007). Ciclos de amplificação

foram os mesmos descrito anteriormente, exceto para a temperatura de anelamento que foi de 55 °C por 1,5 min.

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados utilizando um sistema de eletroforese Mupid®-2plus Submarine (Optima Incorporation, Landmeier, IL) a 150V em gel de agarose a 1,0% e visualizados sob iluminação UV. Foi utilizado marcador de peso 1kb (GeneRuler, Thermo Scientific).

2.4 Clonagem e sequenciamento

Os produtos amplificados por PCR dos segmentos das regiões D2/D3-28S e 18S-ITS-5.8S do rDNA foram purificados utilizando o kit QIAquick Gel (Qiagen, Valencia, CA) ou o kit de purificação de PCR QIAquick (Qiagen, Valencia, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado foi quantificado utilizando NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) espectrofotômetro. Os produtos purificados foram ligados ao vetor de clonagem pDrive amp / kan (Qiagen PCR Cloning Kit) e os produtos de ligação foram então transformados em células recombinantes (Qiagen EZ Competent Cells), conforme as instruções do fabricante (Qiagen, Valencia, CA). As colônias transformadas foram selecionadas baseadas na técnica de seleção azul-branco, em que as células transformadas com vetores contendo DNA recombinante irão produzir colônias brancas e aquelas transformadas com o plasmídeo não recombinante (ou seja, apenas o vetor) crescem em colônias azuis na presença de X- gal (20 mg / mL), 1M IPTG e ampicilina (100 mg / mL).

Os isolados com o DNA alvo (colônias brancas) foram crescidos em meio LB (Luria Bertani) durante a noite a 37 °C com seleção antibiótico. Os plasmídeos foram extraídos utilizando o kit ZR plasmid miniprep (Zymo research) e enviados ao Interdisciplinary Center for Biotechnology Research, University of Florida, Gainesville, para o sequenciamento. Os dados das seqüências de DNA foram comparados com as seqüências depositadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information - www.ncbi.nlm.nih.gov) (BENSON et al., 2013). A ferramenta BLAST foi utilizada para comparar a similaridade dos nucleotídeos com as seqüências depositadas no banco de dados (ALTSCHUL et al., 1997).

2.5 Alinhamento das sequências e análise filogenética

As sequências de DNA foram editadas e alinhadas com os programas Bioedit Sequence Alignment Editor- versão 7.0.4. (HALL, 1999) e MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). Sequências de DNA de *P. brachyurus* depositadas no GenBank foram utilizadas para análise filogenética. As espécies *P. crenatus* (Loof 1960) e *Nacobbus aberrans* (Thorne 1935) Thorne & Allen, 1944 foram utilizadas como outgroup.

Números de acesso das sequências depositadas no GenBank são KF537388 (Pc-Ch1), KC538863 (Pb-Ch2), KF534515 (Pb-Ch3), KF221216 (Pb-Ch4), LC030311 (Pcren) e DQ318727 (Nabe), e as sequências do Brasil dos genes D2-D3 e ITS 1 - rDNA foram depositadas com os números de acesso: Pb-Ac (KT948327), Pb-Rv (KT948328), Pb-Go (KT948329), Pb-SDe (KT948330), Pb-Mon (KT948331), Pb-Jat (KT948332), Pb-BJe (KT948333), Pb-Qui (KT948334), Pb-Ca (KT948335), Pb-SDe1 (KT948336), Pb-Pva (KT948337), Pb-Rv1 (KT948338), Pb-Cm (KT948339), Pb-Tun (KT948340) e Pb-Ca (KT948341), Pb-Jat (KT948342), Pb-SDe1 (KT948343), Pb-Tun (KT948344), Pb-Ac (KT948345), Pb-Rv (KT948346), Pb-Go (KT948347), Pb-SDe (KT948348), Pb-Mon (KT948349), Pb-BJe (KT948350), Pb-Qui (KT948351), Pb-Pva (KT948352), Pb-Rv1 (KT948353), Pb-Cm (KT948354), respectivamente. O alinhamento das sequências foi feito para região D2A-D3B parcial 28S e ITS-5.8S do rDNA das sequências clonadas.

Para avaliar as relações filogenéticas, as sequências de nucleotídeos foram analisadas pelo algoritmo ClustalW do programa Bioedit (THOMPSON et al., 1994). Uma matriz par-a-par para comparar a similaridade genética entre os isolados de *P. brachyurus* foi criada utilizando a ferramenta on-line ClustalW-Needle program (versão 6.6.00). Comandos Prettyplot foram utilizados para gerar a comparação das sequências de nucleotídeos.

As relações filogenéticas entre as sequências foram obtidas por meio de Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) e Neighbor-joining (NJ), através do parâmetro p-distance, o algoritmo máxima parcimônia utilizando o pacote de programas implementados no PAUP * 4.0b10 (SWOFFORD, 2003). Análise de *bootstrap* com 1000 repetições foi conduzida para avaliar o grau de suporte para cada ramo na árvore.

3. RESULTADOS

3.1 Identificação e caracterização das sequências dos isolados de *P. brachyurus*

Os 14 isolados foram identificados como *P. brachyurus*, baseado na amplificação de um fragmento de 267pb, utilizando primers específicos como descrito por Machado et al. (2007) (Figura 1).

As amplificações dos segmentos de expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA e das sequências da região 18S-ITS1-5.8S do rDNA, produziram fragmentos com cerca de 750 pb e 500 pb, respectivamente (Figura 1). Pesquisa BLAST das sequências das regiões D2/D3-28S e 18S-ITS1-5.8S do rDNA confirmou a espécie *P. brachyurus*. Sendo que a similaridade com sequências de *P. brachyurus* depositadas no banco de dados foi maior que 97% para a região D2/D3-28S do rDNA e maior que 90% para a região 18S-ITS1-5.8S do rDNA.

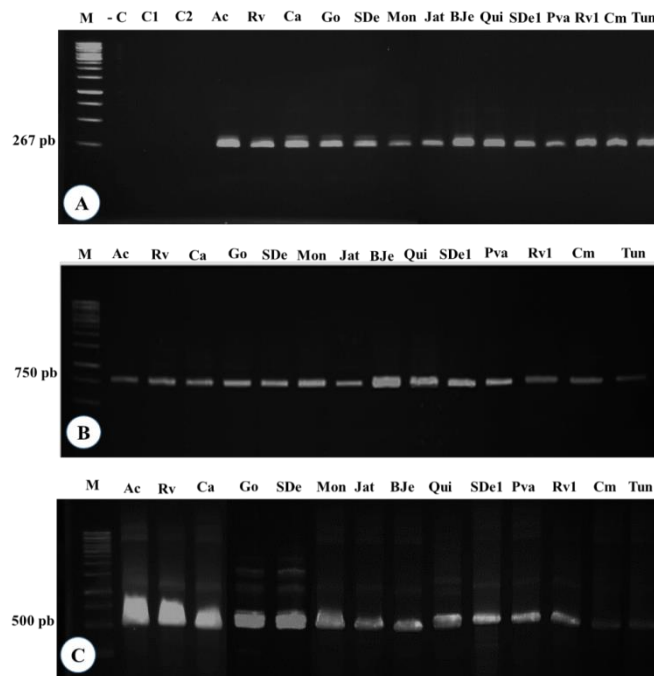


Figura 1. Gel de agarose a 1% com fragmentos específicos dos diferentes isolados de *P. brachyurus* do Brasil. M = marcador molecular de 250pb (GeneRuler). Códigos dos isolados de *P. brachyurus* são apresentados na Tabela 1. A) 18S e ACM7R primers: -C= controle negativo (água); C1 e C2= controle positivo (*P. scribneri* e *P. penetrans*); B) D2A-D3B primers; C) 18S e RN58SR primers.

A comparação par-a-par entre os isolados apresentou divergências de até 2,0% para a região D2/D3-28S do rDNA, enquanto que, a região 18S-ITS1-5.8s do rDNA resultou numa divergência de até 8,7% (Figura 2).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1.Pb-Ac	-	99.1	99.2	99.2	99.4	99.0	99.2	99.2	98.1	97.8	99.1	99.4	98.9	98.8	98.7	98.6	98.8	98.6
2.Pb-Rv	96.4	-	99.1	99.6	99.4	99.4	99.1	99.6	98.5	98.2	99.6	99.7	99.5	99.5	99.6	98.5	98.7	99.5
3.Pb-Ca	91.1	93.5	-	99.2	99.4	99.2	99.1	99.2	98.1	97.8	99.1	99.4	98.8	98.8	98.7	97.4	97.8	98.0
4.Pb-Go	93.2	95.2	97.5	-	99.4	99.5	99.1	100.0	98.6	98.3	99.6	99.9	99.5	99.4	99.2	99.4	98.7	98.6
5.Pb-SDe	93.5	93.3	90.7	90.8	-	99.1	99.7	99.4	98.2	98.0	99.5	99.5	99.0	99.2	99.0	98.6	98.8	99.1
6.Pb-Mon	92.2	95.2	98.0	97.3	92.2	-	99.0	99.5	98.5	98.2	99.6	99.6	99.1	99.1	99.0	98.7	98.7	98.8
7.Pb-Jat	92.0	92.0	90.0	90.3	96.5	90.8	-	99.1	98.0	97.7	99.4	99.2	98.7	99.0	98.7	98.7	98.8	99.0
8.Pb-BJe	93.6	94.3	93.3	94.1	97.3	93.2	95.8	-	98.6	98.3	99.6	99.9	99.5	99.4	99.2	98.5	98.6	98.6
9.Pb-Qui	95.6	95.1	90.8	92.1	96.6	91.7	95.4	96.2	-	99.7	98.6	98.7	98.2	98.2	98.1	98.6	98.8	99.1
10.Pb-SDe1	98.7	95.0	91.5	92.6	94.2	92.5	92.7	94.3	94.7	-	98.3	98.5	98.0	98.0	98.1	97.4	97.6	97.7
11.Pb-Pva	96.2	96.4	93.2	94.5	96.0	95.2	94.8	96.8	95.6	96.9	-	99.7	99.2	99.2	99.2	98.5	98.8	99.1
12.Pb-Rv1	98.3	96.8	92.4	93.6	92.8	94.3	91.7	94.1	95.4	96.9	96.8	-	99.5	99.5	99.4	98.7	99.0	99.2
13.Pb-Cm	96.6	96.8	92.3	94.7	94.9	92.8	93.0	96.8	96.2	95.6	97.0	96.8	-	99.5	99.1	98.2	98.5	99.0
14.Pb-Tun	93.7	95.2	97.6	97.5	91.6	98.6	90.6	93.0	92.6	94.0	95.0	94.3	93.7	-	99.1	98.2	98.5	99.0
15.Pb-Ch1	94.6	93.3	90.3	91.1	94.8	91.0	93.1	94.5	93.7	95.6	93.7	93.7	93.6	91.4	-	100.0	98.1	98.0
16.Pb-Ch2	95.0	93.9	90.5	91.7	95.0	91.2	93.3	94.5	94.3	95.6	94.3	94.1	94.0	91.6	99.2	-	98.1	98.0
17.Pb-Ch3	95.4	94.3	90.9	92.0	95.0	91.6	93.3	94.5	94.3	95.9	94.3	94.5	94.3	91.9	98.8	99.6	-	98.2
18.Pb-Ch4	95.4	94.3	90.9	92.0	95.0	91.6	93.3	94.5	94.3	95.9	94.3	94.5	94.3	91.9	98.8	99.6	100.0	--

Figura 2. Matriz de valores de similaridade (%) das sequências dos isolados de *Pratylenchus brachyurus* do rDNA. Acima dos traços (-) segmentos de expansão D2-D3 parcial 28S e abaixo dos traços (-) região ITS-1.

3.2 Alinhamento múltiplo das sequências e análise filogenética

As sequências dos isolados de *P. brachyurus*, deste estudo, foram alinhadas com sequências disponíveis no banco de dados GenBank. A análise das sequências revelou variabilidade entre os isolados. Sendo que, a região D2/D3-28S do rDNA foi menos variável do que a região 18S-ITS1-5.8S (Figura 3).

Pb-Aa	TGTATT CAGCTGCGTGGTGTAA CGGCCTCCGGT GCTGGCGTCTCCAGATT	150
Pb-Rv	TGTATT CAGCTGCGTGGTGTAA CGGCCTCCGGT GCTGGCGTCTCCAGATT	150
Pb-Go	TGTATT CAGCTGCGTGGTGTAA CGGCCTCCGGT GCTGGCGTCTCCAGATT	150
Pb-SDe	TGTATT CAGCTGCGTGGTGTAA CGGCCTCCGGT GCTGGCGTCTCCAGATT	150
Pb-Man	TGTATT CAGCTGCGTGGTGTAA CGGCCTCCGGT GCTGGCGTCTCCAGATT	150
Pb-Jat	TGTATT CAGCTGCGTGGTGTAA CGGCCTCCGGT GCTGGCGTCTCCAGATT	150
Pb-BJe	TGTATT CAGCTGCGTGGTGTAA CGGCCTCCGGT GCTGGCGTCTCCAGATT	150
Pb-Qui	TGTATT CAGCTGCGTGGTGTAA CGGCCTCCGGT GCTGGCGTCTCCAGATT	150
Pb-Co	TGTATT CAGCTGCGTGGTGTAA CGGCCTCCGGT GCTGGCGTCTCCAGATT	150
Pb-SDe1	TGTATT CAGCTGCGTGGTGTAA CGGCCTCCGGT GCTGGCGTCTCCAGATT	150
Pb-Pva	TGTATT CAGCTGCGTGGTGTAA CGGCCTCCGGT GCTGGCGTCTCCAGATT	150
Pb-Rv1	TGTATT CAGCTGCGTGGTGTAA CGGCCTCCGGT GCTGGCGTCTCCAGATT	150
Pb-Cm	TGTATT CAGCTGCGTGGTGTAA CGGCCTCCGGT GCTGGCGTCTCCAGATT	150
Pb-Tun	TGTATT CAGCTGCGTGGTGTAA CGGCCTCCGGT GCTGGCGTCTCCAGATT	150
Pb-Ch1	TGTATT CAGCTGCGTGGTGTAA CGGCCTCCGGT GCTGGCGTCTCCAGATT	150
Pb-Ch2	TGTATT CAGCTGCGTGGTGTAA CGGCCTCCGGT GCTGGCGTCTCCAGATT	150
Pb-Ch3	TGTATT CAGCTGCGTGGTGTAA CGGCCTCCGGT GCTGGCGTCTCCAGATT	150
Pb-Ch4	TGTATT CAGCTGCGTGGTGTAA CGGCCTCCGGT GCTGGCGTCTCCAGATT	150

Pb-Aa	GGGAA CAGTGCTGGT CCGCCGAGAGCTGTGCTGTGCATTTGCAAGTGGAG	200
Pb-Rv	GGGAA CAGTGCTGGT CCGCCGAGAGCTGTGCTGTGCATTTGCAAGTGGAG	200
Pb-Go	GGGAA CAGTGCTGGT CCGCCGAGAGCTGTGCTGTGCATTTGCAAGTGGAG	200
Pb-SDe	GGGAA CAGTGCTGGT CCGCCGAGAGCTGTGCTGTGCATTTGCAAGTGGAG	200
Pb-Man	GGGAA CAGTGCTGGT CCGCCGAGAGCTGTGCTGTGCATTTGCAAGTGGAG	200
Pb-Jat	GGGAA CAGTGCTGGT CCGCCGAGAGCTGTGCTGTGCATTTGCAAGTGGAG	200
Pb-BJe	GGGAA CAGTGCTGGT CCGCCGAGAGCTGTGCTGTGCATTTGCAAGTGGAG	200
Pb-Qui	GGGAA CAGTGCTGGT CCGCCGAGAGCTGTGCTGTGCATTTGCAAGTGGAG	200
Pb-Co	GGGAA CAGTGCTGGT CCGCCGAGAGCTGTGCTGTGCATTTGCAAGTGGAG	200
Pb-SDe1	GGGAA CAGTGCTGGT CCGCCGAGAGCTGTGCTGTGCATTTGCAAGTGGAG	200
Pb-Pva	GGGAA CAGTGCTGGT CCGCCGAGAGCTGTGCTGTGCATTTGCAAGTGGAG	200
Pb-Rv1	GGGAA CAGTGCTGGT CCGCCGAGAGCTGTGCTGTGCATTTGCAAGTGGAG	200
Pb-Cm	GGGAA CAGTGCTGGT CCGCCGAGAGCTGTGCTGTGCATTTGCAAGTGGAG	200
Pb-Tun	GGGAA CAGTGCTGGT CCGCCGAGAGCTGTGCTGTGCATTTGCAAGTGGAG	200
Pb-Ch1	GGGAA CAGTGCTGGT CCGCCGAGAGCTGTGCTGTGCATTTGCAAGTGGAG	200
Pb-Ch2	GGGAA CAGTGCTGGT CCGCCGAGAGCTGTGCTGTGCATTTGCAAGTGGAG	200
Pb-Ch3	GGGAA CAGTGCTGGT CCGCCGAGAGCTGTGCTGTGCATTTGCAAGTGGAG	200
Pb-Ch4	GGGAA CAGTGCTGGT CCGCCGAGAGCTGTGCTGTGCATTTGCAAGTGGAG	200

B) ITS-1

Pb-Co	TTGATTA CGTCCCTGCCCTTTGTACA CACCGCCCGTCCGCTGCCCGGGACT	50
Pb-Jat	TTGATTA CGTCCCTGCCCTTTGTACA CACCGCCCGTCCGCTGCCCGGGACT	50
Pb-SDe1	TTGATTA CGTCCCTGCCCTTTGTACA CACCGCCCGTCCGCTGCCCGGGACT	50
Pb-Tun	TTGATTA CGTCCCTGCCCTTTGTACA CACCGCCCGTCCGCTGCCCGGGACT	50
Pb-Aa	TTGATTA CGTCCCTGCCCTTTGTACA CACCGCCCGTCCGCTGCCCGGGACT	50
Pb-Rv	TTGATTA CGTCCCTGCCCTTTGTACA CACCGCCCGTCCGCTGCCCGGGACT	50
Pb-Go	TTGATTA CGTCCCTGCCCTTTGTACA CACCGCCCGTCCGCTGCCCGGGACT	50
Pb-SDe	TTGATTA CGTCCCTGCCCTTTGTACA CACCGCCCGTCCGCTGCCCGGGACT	50
Pb-Man	TTGATTA CGTCCCTGCCCTTTGTACA CACCGCCCGTCCGCTGCCCGGGACT	50
Pb-BJe	TTGATTA CGTCCCTGCCCTTTGTACA CACCGCCCGTCCGCTGCCCGGGACT	50
Pb-Qui	TTGATTA CGTCCCTGCCCTTTGTACA CACCGCCCGTCCGCTGCCCGGGACT	50
Pb-Pva	TTGATTA CGTCCCTGCCCTTTGTACA CACCGCCCGTCCGCTGCCCGGGACT	50
Pb-Rv1	TTGATTA CGTCCCTGCCCTTTGTACA CACCGCCCGTCCGCTGCCCGGGACT	50
Pb-Cm	TTGATTA CGTCCCTGCCCTTTGTACA CACCGCCCGTCCGCTGCCCGGGACT	50
Pb-Ch1	TTGATTA CGTCCCTGCCCTTTGTACA CACCGCCCGTCCGCTGCCCGGGACT	50
Pb-Ch2	TTGATTA CGTCCCTGCCCTTTGTACA CACCGCCCGTCCGCTGCCCGGGACT	50
Pb-Ch3	TTGATTA CGTCCCTGCCCTTTGTACA CACCGCCCGTCCGCTGCCCGGGACT	50
Pb-Ch4	TTGATTA CGTCCCTGCCCTTTGTACA CACCGCCCGTCCGCTGCCCGGGACT	50

Pb-Co	GAGTCATTT CGAGAAACTTGA GGACCCTCAGCTTCCTTCCTGGTTTGGGCCACC	100
Pb-Jat	GAGTCATTT CGAGAAACTTGA GGACCCTCAGCTTCCTTCCTGGTTTGGGCCACC	100
Pb-SDe1	GAGTCATTT CGAGAAACTTGA GGACCCTCAGCTTCCTTCCTGGTTTGGGCCACC	100
Pb-Tun	GAGTCATTT CGAGAAACTTGA GGACCCTCAGCTTCCTTCCTGGTTTGGGCCACC	100
Pb-Aa	GAGTCATTT CGAGAAACTTGA GGACCCTCAGCTTCCTTCCTGGTTTGGGCCACC	100
Pb-Rv	GAGTCATTT CGAGAAACTTGA GGACCCTCAGCTTCCTTCCTGGTTTGGGCCACC	100
Pb-Go	GAGTCATTT CGAGAAACTTGA GGACCCTCAGCTTCCTTCCTGGTTTGGGCCACC	100
Pb-SDe	GAGTCATTT CGAGAAACTTGA GGACCCTCAGCTTCCTTCCTGGTTTGGGCCACC	100
Pb-Man	GAGTCATTT CGAGAAACTTGA GGACCCTCAGCTTCCTTCCTGGTTTGGGCCACC	100
Pb-BJe	GAGTCATTT CGAGAAACTTGA GGACCCTCAGCTTCCTTCCTGGTTTGGGCCACC	100
Pb-Qui	GAGTCATTT CGAGAAACTTGA GGACCCTCAGCTTCCTTCCTGGTTTGGGCCACC	100
Pb-Pva	GAGTCATTT CGAGAAACTTGA GGACCCTCAGCTTCCTTCCTGGTTTGGGCCACC	100
Pb-Rv1	GAGTCATTT CGAGAAACTTGA GGACCCTCAGCTTCCTTCCTGGTTTGGGCCACC	100
Pb-Cm	GAGTCATTT CGAGAAACTTGA GGACCCTCAGCTTCCTTCCTGGTTTGGGCCACC	100
Pb-Ch1	GAGTCATTT CGAGAAACTTGA GGACCCTCAGCTTCCTTCCTGGTTTGGGCCACC	100
Pb-Ch2	GAGTCATTT CGAGAAACTTGA GGACCCTCAGCTTCCTTCCTGGTTTGGGCCACC	100
Pb-Ch3	GAGTCATTT CGAGAAACTTGA GGACCCTCAGCTTCCTTCCTGGTTTGGGCCACC	100
Pb-Ch4	GAGTCATTT CGAGAAACTTGA GGACCCTCAGCTTCCTTCCTGGTTTGGGCCACC	100

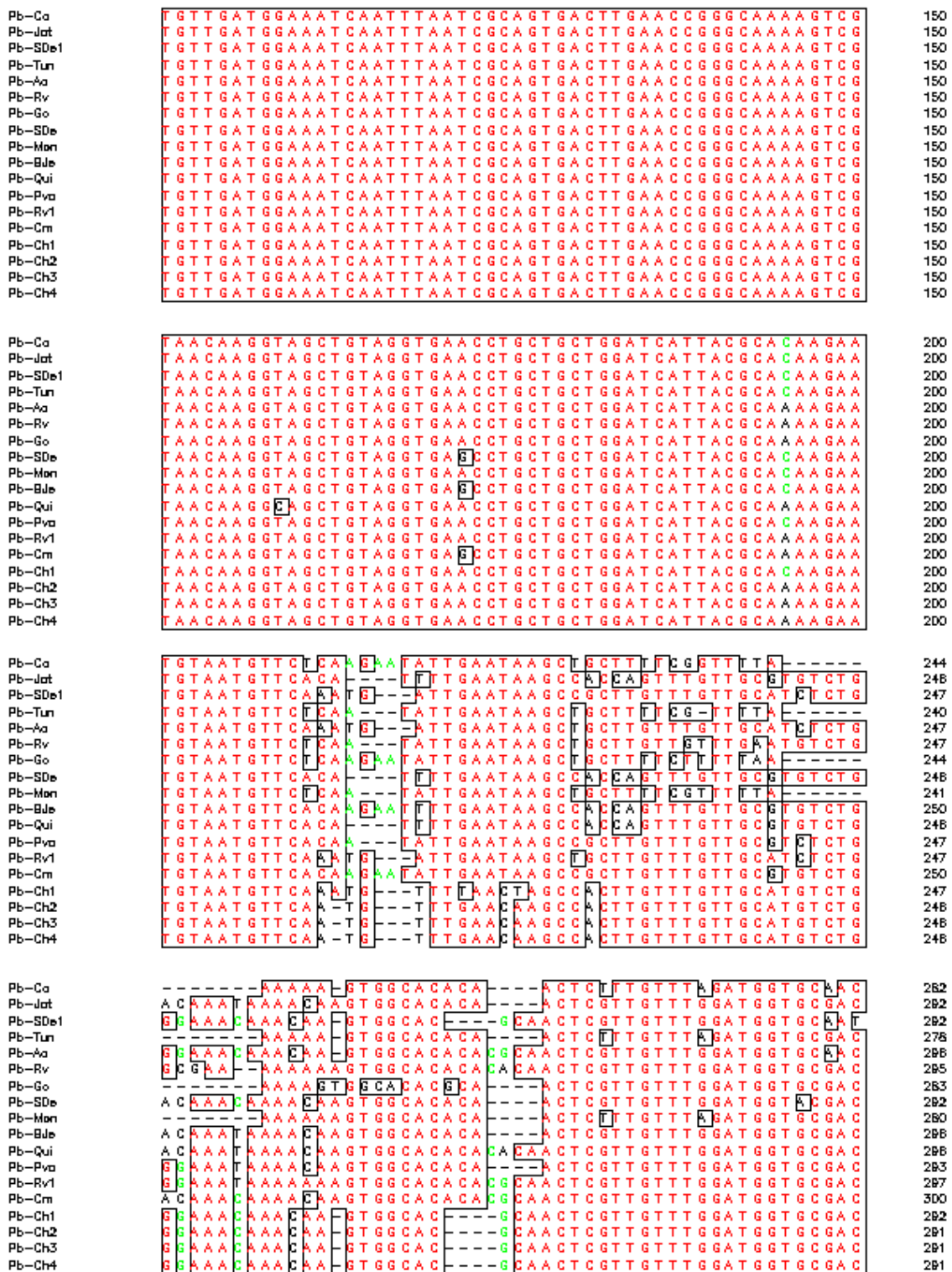


Figura 3. Prettyplot múltiplo alinhamento das sequências de diferentes isolados de *Pratylenchus brachyurus* do Brasil e do banco de dados GenBank. Seção A representa as sequências nucleotídicas no segmento de expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA. Seção B representa região 18S-ITS1-5.8s do rDNA.

O alinhamento também mostrou várias mutações pontuais em ambas as regiões amplificadas, principalmente na região entre 200 a 300 pb (Figura 3). Sequências de ambos os isolados Pb-Ca e Pb-SDe1, particularmente na região D2/D3-28S, mostraram um elevado número de sítios informativos para parcimônia e variabilidade de nucleotídeos em comparação com outras sequências, revelando variabilidade dentro de *P. brachyurus* (Figura 3A).

As topologias das árvores de NJ e UPGMA inferidas com base nas sequências da região D2/D3-28S foram idênticas e congruentes. A árvore filogenética das sequências da região D2/D3-28S formaram três clados. No primeiro clado (valor de *bootstrap* de 71%) estão agrupados isolados dos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso e Paraná. Enquanto que no segundo clado (96% de *bootstrap*) agrupou um isolado do estado do Mato Grosso e outro da Bahia. No terceiro clado (100% de *bootstrap*), agrupou as sequências de referência (Figura 4). Interessante notar, que nesta árvore formou dois grupos no primeiro clado, onde o primeiro grupo (*bootstrap* 64%) agrupou uma sequência de referência (KCK537388) e quatro isolados de Goiás. Enquanto que, no segundo grupo (*bootstrap* 60%) agruparam isolados de Goiás e do Paraná.

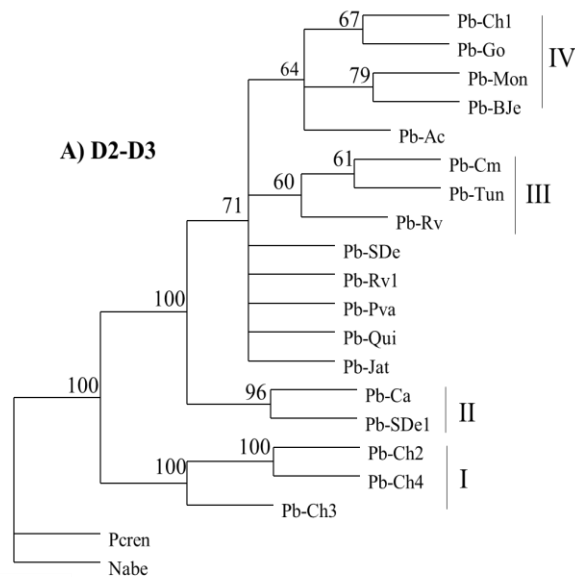


Figura 4. Filograma da relação filogenética de *Pratylenchus brachyurus* baseado no alinhamento das sequências do seguimento de expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA. Árvore gerada utilizando Neighbor-joining (NJ). Valores de *bootstrap* a partir de 1000 repetições são mostrados nos nós das árvores. A análise de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean gerou mesma topologia (dados não apresentados).

As relações filogenéticas inferidas a partir de NJ e UPGMA baseadas nas sequências da região 18S-ITS1-5.8S do rDNA foram também idênticas e congruentes, resultando árvores com mesma topologia. A árvore filogenética das sequências da região 18S-ITS-5.82 do rDNA apresentou dois cladogramas distintos. Sendo que no primeiro clado agruparam os isolados de *P. brachyurus* deste estudo, com valor de *bootstrap* de 61%. Enquanto que as sequências de referência se agruparam no segundo clado, com valor de *bootstrap* de 99% (Figura 5). Interessante notar, que no primeiro clado formaram três grupos, sendo que o primeiro com valor de *bootstrap* de 91%, o segundo com 78% e o terceiro com valor de 82%.

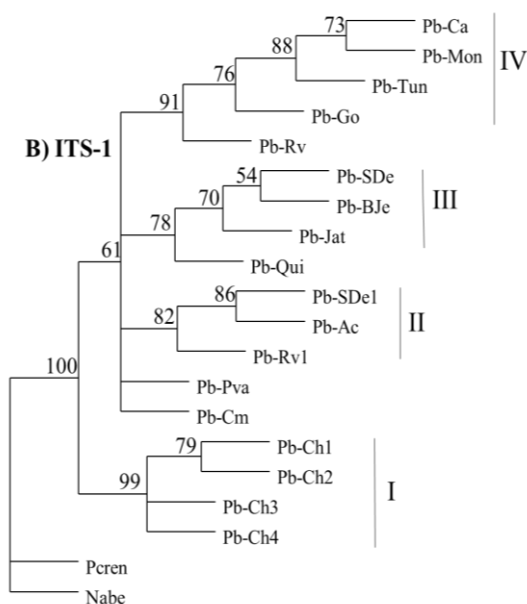


Figura 5. Filograma da relação filogenética de *Pratylenchus brachyurus* baseado no alinhamento das sequências da região 18S-ITS1-5.8s do rDNA. Árvore gerada utilizando Neighbor-joining (NJ). Valores de *bootstrap* a partir de 1000 repetições são mostrados nos nós das árvores. A análise de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean gerou mesma topologia (dados não apresentados).

Uma árvore filogenética foi inferida a partir de curta sequências (298pb) da região ITS1, com a finalidade de observar as relações filogenéticas entre os 14 isolados de *P. brachyurus*. A árvore de curta sequência região ITS formou três cladogramas. O primeiro clado agrupou isolados da Bahia, Goiás, Mato Grosso e Paraná (valor de *bootstrap* 52%). Enquanto que o segundo clado agrupou isolados de Goiás, Mato Grosso e Paraná (valor de *bootstrap* 74%). No terceiro clado, agruparam isolados da Bahia e Goiás (valor de *bootstrap* 85%)

(Figura 6). A análise de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean gerou mesma topologia (dados não apresentados).

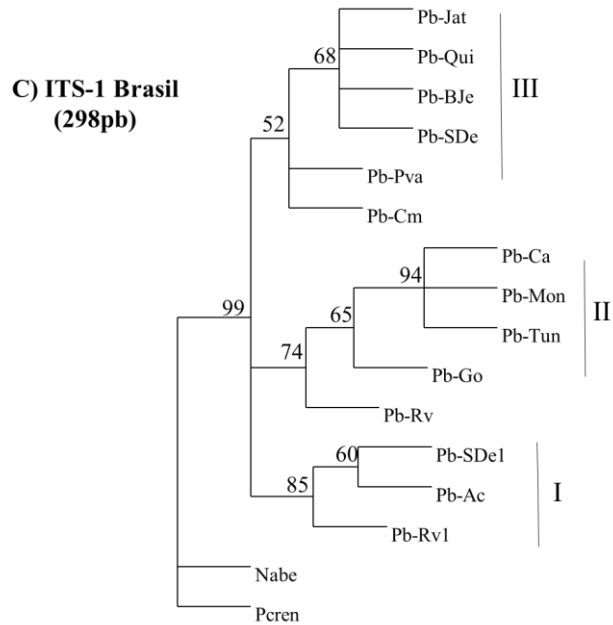


Figura 6. Filograma da relação filogenética de *Pratylenchus brachyurus* baseado no alinhamento de curtas sequências da região ITS1 do rDNA. Árvore gerada utilizando Neighbor-joining (NJ). Valores de *bootstrap* a partir de 1000 repetições são mostrados nos nós das árvores. A análise de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean gerou mesma topologia (dados não apresentados).

4. DISCUSSÃO

A identificação de espécies de *Pratylenchus* tem sido uma tarefa difícil por causa da morfologia conservada de membros deste gênero e sua variabilidade intra e interespecífica (DE LUCA et al., 2011). Variações nos genes D2-D3 (DE LUCA et al., 2004; DE LA PEÑA et al., 2006; HAJIEGHRARI et al., 2007; DE LUCA et al., 2012) e ITS (WAEYENBERGE et al., 2000; TROCOLLI et al., 2008; DE LUCA et al., 2010; DE LUCA et al., 2011; DE LUCA et al., 2012; PALOMARES-RIUS et al., 2014; MACHADO et al., 2015) são típicas em *Pratylenchus* spp. Sequências de DNA e análise filogenética de amostras de nematoides proporcionam critérios adicionais para a identificação e delimitação das espécies dentro do gênero (DE LUCA et al., 2011).

Neste estudo, a análise filogenética com base no segmento de expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA mostrou uma separação entre os isolados brasileiros. Onde os isolados Pb-Ca e Pb-SDe1 formaram um clado com valor de bootstrap de 96%, sugerindo que estes isolados estão intimamente relacionados. Em contraste, a posição destes dois isolados é completamente diferente com base na árvore filogenética da região 18S-ITS1-5.8s do rDNA. Além disso, a análise baseada nas regiões D2/D3-28S e 18S-ITS1-5.8S do rDNA mostrou variação intraespecífica dentro dos isolados, independente da origem geográfica, apesar de todos derivarem de um ancestral comum.

A topologia da árvore inferida a partir da região D2/D3-28S do rDNA não foi congruente com a topologia da árvore da região 18S-ITS1-5.8S do rDNA. Entretanto, as sequências da região 18S-ITS1-5.8S do rDNA agruparam em um único clado, apesar da considerável variabilidade nucleotídica de até 8,7% entre as 14 sequências deste estudo. Estes dados suportam trabalho anterior, em que sequências obtidas a partir da região ITS-1 e ITS-2 do mesmo indivíduo mostraram elevado grau de variabilidade nucleotídica, bem como comparações entre indivíduos de uma mesma população. A dissimilaridade nucleotídica variou até 7% tanto para *P. vulnus*, como para *P. neglectus* (DE LUCA et al., 2011). *Pratylenchus thornei* e *P. lentis* a diferença nucleotídica foi de 6 e 5%, respectivamente (DE LUCA et al., 2011). Diversidade nucleotídica de até 1% foi observada para *P. bolivianus*, *P. mediterraneus* e *P. pseudocoffeae* (DE LUCA et al., 2011). Sequências variantes em clones de *P. brachyurus* da região ITS-1 também foram observadas em isolados brasileiros (MACHADO et al., 2015).

Região ITS é o mais variável *loci* identificado no gênero *Pratylenchus* (WAEYENBERGE et al., 2000) e considerada como ferramenta adequada para identificação via PCR deste nematoide, porque são sequências repetitivas e submetidas à homogeneização, fatores ligados à eficiência, sensibilidade e especificidade de amplificação (GASSER et al., 2008; WAEYENBERGE et al., 2009; DE LUCA et al., 2011). Os segmentos de análise comparativa desta região evoluíram mais rápido do que os segmentos de expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA e acumularam mais mudanças de substituição, permitindo avaliar a heterogeneidade entre espécies, tornando as sequências da região ITS úteis para a reconstrução filogenética (DE LUCA et al., 2011).

Genes ribossomais são organizados com o genoma nuclear com o arranjo de repetições em tandem (EICKBUSH; EICKBUSH, 2007). Estes arranjos estão sob um processo de evolução concertada, homogeneizando sequências dentro de um genoma, mas permitindo divergências no rRNA entre as espécies isoladas reprodutivamente (BIK et al., 2013; PALOMARES-RIUS et al., 2014). Em alguns casos, este processo de homogeneização de sequências pode não ser suficientemente rápido nas repetições do rRNA ou novas espécies podem surgir a partir de eventos de hibridação recentes, tais como em espécies partenogênicas mitóticas do gênero *Meloidogyne* (ADAMS et al., 2010; PALOMARES-RIUS et al., 2014).

Com os dados obtidos neste estudo, foi possível observar a presença de variação nucleotídica intraespecífica no genoma entre os isolados de *P. brachyurus* do Brasil, através do rDNA. No entanto, os dados são insuficientes para afirmar a existência de um complexo de espécies crípticas, como já foi revelado com *P. coffeae* (DUNCAN et al., 1999; MIZUKUBO et al., 2003), *P. penetrans* (SUBBOTIN et al., 2008), *P. lentis* (TROCCOLI et al., 2008) e *P. hippeastrum* (DE LUCA et al., 2010).

Estudos posteriores serão necessários para entender a evolução dentro das espécies do gênero *Pratylenchus*, uma amostragem mais ampla dos táxons, bem como o modo de reprodução que pode fornecer compreensão da variabilidade intraespecífica, além de buscar características mais promissoras na análise morfológica.

5. CONCLUSÃO

- a) Este estudo revelou a presença de variação intraespecífica entre os isolados de *P. brachyurus* de diferentes origens geográfica no Brasil.
- b) As sequências do seguimento de expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA e da região 18S-ITS1-5.8S do rDNA foram capazes de distinguir *P. brachyurus* de *P. crenatus*.
- c) As sequências da região 18S-ITS1-5.8S do rDNA agruparam todos os isolados de *P. brachyurus* em um único clado.

6. REFERÊNCIAS

- ABEBE, E.; MEKETE, T.; THOMAS, W. K. A critique of current methods in nematode taxonomy. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 312-323, 2011.
- ADAMS, B. J.; DILLMAN, A. R.; FINLINSON, C. Molecular taxonomy and phylogeny. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Eds). **Root-knot nematodes**. Wallingford, UK, CABI, p. 119-138, 2010.
- AL-BANNA, L.; WILLIAMSON, V.; GARDNER, S. L. Phylogenetic analysis of nematodes of the genus *Pratylenchus* using nuclear 26S rDNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution Editorial Board**, v. 7, p. 94-102, 1997.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ALVES, T. C. U.; SILVA, R. A.; BORGES, D. C.; MOTTA, L. C. C.; KOBAYASTI, L. Reações de cultivares de soja ao nematoide das lesões radiculares *Pratylenchus brachyurus*. **Revista Biodiversidade**, v. 10, p. 73-79, 2011.
- BENSON, D. A.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; SAYERS, E. W. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 36-42, 2013.
- BIK, H. M.; FOURNIER, D.; SUNG, W.; BERGERON, R. D.; THOMAS, W. K. Intra-genomic variation in the ribosomal repeats of nematodes. **PLOS ONE**, v. 8, p. 1-8 2013.
- CASTILLO, P.; VOVLAS, N. *Pratylenchus* (Nematoda: *Pratylenchidae*): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management. **Nematology Monographs and Perspectives**. v. 6, 2007. 529p.
- COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. **State Nematology and Entomology Research Station**, p. 72, 1972.
- DE LA PEÑA, E.; MOENS, M.; VAN AELST, A.; KARSSSEN, G. Description of *Pratylenchus dunensis* spn. (Nematoda: Pratylenchidae), a root-lesion nematode associated with the dune grass *Ammophila arenaria*. **Nematology**, v. 8, p. 79-88, 2006.
- DE LUCA, F.; FANELLI, E.; DI VITO, M.; REYES, A.; DE GIORGI, C. Comparison of the sequences of the D3 expansion of the 26S ribosomal genes reveals different degrees of heterogeneity in different populations and species of *Pratylenchus* from the Mediterranean region. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 949-957, 2004.

DE LUCA, F.; TROCCOLI, A.; DUNCAN, L. W.; SUBBOTIN, S. A.; WAEYENBERGE, L.; MOENS, M.; INSERRA, R. N. Characterization of a population of *Pratylenchus hippeastri* from bromeliads and description of two related new species, *P. floridensis* n. sp. and *P. parafloridensis* sp., from grasses in Florida. **Nematology**, v. 12, p. 847-868, 2010.

DE LUCA, F.; REYES, A.; TROCCOLI, A.; CASTILLO, P. "Molecular Variability and Phylogenetic Relationships among Different Species and Populations of *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae) as Inferred from the Analysis of the ITS rDNA," **European Journal of Plant Pathology**, v. 130, p. 415-426, 2011.

DE LUCA, F.; TROCCOLI, A.; DUNCAN, L. W.; SUBBOTIN, S. A.; WAEYENBERGE, L.; COYNE, D. L.; BRENTU, F. C.; INSERRA, R. N. *Pratylenchus speijeri* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae), a new root-lesion nematode pest of plantain in West Africa. **Nematology**, v. 14, p. 987-1004, 2012.

DUNCAN, L. W.; INSERRA, R. N.; THOMAS, W. K.; DUNN, D.; MUSTIKA, I.; FRISSE L. M.; MENDES, M. L.; MORRIS, K.; KAPLAN, D. T. Molecular and morphological analysis of isolates of *Pratylenchus coffeae* and closely related species. **Nematropica**, v.29, n. 61–80, 1999.

EICKBUSH, T. H.; EICKBUSH, D. G. Finely orchestrated movements: Evolution of ribosomal RNA genes. **Genetics**, v. 175, p. 477-485, 2007.

FLOYD, R.; EYUALEM, A.; PAPERT, A.; BLAXTER, M. Molecular barcodes for soil nematode identification. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 839-850, 2002.

GASSER, R. B.; BOTT, N. J.; CHILTON, N. B.; HUNT, P.; BEVERIDGE, I. Toward practical, DNA-based diagnostic methods for parasitic nematodes of livestock- Bionomic and biotechnological implications. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 325-334, 2008.

GOULART, A. M. C. Aspectos gerais sobre nematoides das lesões radiculares (Gênero *Pratylenchus*). 2008. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/571924/1/doc219.pdf>>. Acesso 04 de agosto de 2015.

HAJIEGHRARI, B., TORABI-GIGLOU, M.; WAEYENBERGE, L. Comparative d2/d3 LSU-rDNA sequence study of some Iranian *Pratylenchus loosi* populations. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 2458-2466, 2007.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HANDOO, Z. A.; GOLDEN, A. M. A key and diagnostic compendium to the species of the genus *Pratylenchus* filipjev, 1936 (lesion nematodes). **Journal of Nematology**, v. 21, p. 202-218, 1989.

JONES, M. G. K.; FOSU-NYARKO, J. Molecular biology of root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) and their interaction with host plants. **Annals of Applied Biology**, v. 164, p.163-181, 2014.

MACHADO, A. C. Z.; FERRAZ, L. C. C. B.; OLIVEIRA, C. M. G. Development of a species-specific reverse primer for the molecular diagnostic of *Pratylenchus brachyurus*. **Nematropica**,v. 37, p. 249-257, 2007.

MACHADO,A. C. Z.; SIQUEIRA, K. M. S.; FERRAZ, L. C. C.; INOMOTO, M. M.; BESSI, R.; HARAKAVA, R.; OLIVEIRA,C. M. G. Characterization of Brazilian populations of *Pratylenchus brachyurus* using morphological and molecular analyses.**Tropical Plant Pathology**, v. 40, p. 102-110, 2015.

MIZUKUBO, T.; ORUI, Y.; HANADA, K.; SANO, Z. Microevolutionary trend in *Pratylenchus coffeae* sensu stricto (Nematoda: Pratylenchidae): the diversity in PCR-RFLP phenotype, compatibility on host plants and reproductive segregation. **Japanese Journal of Nematology**, v.33, p. 57-76, 2003.

NICOL, P.; GILL, R.; FOSU-NYARKO, J.; JONES, M. G. K. De novo Analysis and functional classification of the transcriptome of the root lesion nematode, *Pratylenchus thornei*, after 454 GS FLX sequencing.**International Journal for Parasitology**, v. 42, p. 225-237, 2012.

PALOMARES-RIUS, J. E.; LANDA, B. B.; TANHA MAAFI, Z.; HUNT, D. J., CASTILLO P. Comparative morphometrics and ribosomal DNA sequence analysis of *Longidorus orientalis* Loof, 1983 (Nematoda:Longidoridae) from Spain and Iran. **Nematology**, v. 12, p. 631-640, 2010.

PALOMARES-RIUS, J. E.; GUESMI, I.; HORRIGUE-RAOUANI, N.; CANTALAPIEDRA-NAVARRETE, C.; LIÉBANAS, G.; CASTILLO, P. Morphological and molecular characterisation of *Pratylenchus oleae* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae) parasitizing wild and cultivated olives in Spain and Tunisia. **International Journal for Parasitology**, v. 140, p. 53-67, 2014.

PAYAN, L. A.; DICKSON, D. W. Comparison of populations of *Pratylenchus brachyurus* based on isozyme phenotypes. **Journalof Nematology**, v. 22, p. 538-545, 1990.

POWERS, T. Nematode molecular diagnostics: From Bands to Barcodes. **Annual Review Phytopathology**, v. 42, p. 367-83, 2004.

SEUTIN, G.; WHITE, B. N.; BOAG, P. T. Preservation of avian blood tissue samples for DNA analyses. **CanadianJournal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie**, v. 69, p. 82-90, 1991.

SILVA, R. A.; SERRANO, M. A. S.; GOMES, A. C.; BORGES, D. C.; SOUZA, A. A.; ASMUS, G. L.; INOMOTO, M. M. Ocorrência de *Pratylenchus brachyurus* *Meloidogyne incognita* na cultura do algodoeiro no Estado do Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, 337-337, 2004.

SUBBOTIN, S. A.; VOVLAS, N.; CROZZOLI, R.; STURHAN, D.; LAMBERTI, F.; MOENS, M.; BALDWIN, J. G. Phylogeny of *Criconematina* Siddiqi, 1980 (Nematoda: Tylenchida) based on morphology and D2-D3 expansion segments of the 28S-rRNA gene sequences with application of a secondary structure model. **Nematology**, v. 7, p. 927-944, 2005.

SUBBOTIN, S. A.; RAGSDALE, E. J.; MULLENS, T.; ROBERTS, P. A.; MUNDO-OCAMPO, M.; BALDWIN, J. G. A phylogenetic framework for root lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda): Evidence from 18S and D2-D3 expansion segments of 28S ribosomal RNA genes and morphological characters. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, p. 491-505, 2008.

SWOFFORD, D. L. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. 2003.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TARJAN, A. C.; FREDERICK, J. J. Intraspecific morphological variation among populations of *Pratylenchus brachyurus* and *P. penetrans*. **Journal of Nematology**, v. 10, p. 152-160, 1978.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J.; CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TROCCOLI, A.; DE LUCA, F.; HANDOO, Z. A.; DI VITO, M. Morphological and molecular characterization of *Pratylenchus lentis* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae) from Sicily. **Journal of Nematology**, v. 40, p. 190-196, 2008.

WAEYENBERGE, L.; RYSS, A.; MOENS, M.; PINOCHET, J.; VRAIN, T. C. Molecular characterization of 18 *Pratylenchus* species using rDNA restriction fragment length polymorphism. **Nematology**, v. 2, p. 135-142, 2000.

WAEYENBERGE, L.; VIAENE, N.; MOENS, M. Species specific duplex PCR for the detection of *Pratylenchus penetrans*. **Nematology**, v. 11, p. 847-857, 2009.

CAPÍTULO 2

Capacidade reprodutiva de populações de *Pratylenchus brachyurus* em milho e soja

Capacidade reprodutiva de populações de *Pratylenchus brachyurus* em milho e soja

RESUMO

O aumento nas populações do nematoide das lesões, *Pratylenchus brachyurus*, tem causado preocupação em diversas regiões agrícolas do Brasil. A maioria dos genótipos cultivados favorecem o desenvolvimento do nematoide, além de apresentarem variação de resistência dentro da mesma espécie. Assim, dois ensaios foram conduzidos em casa de vegetação no período de outubro de 2015 a janeiro de 2016 com os objetivos de comparar a reprodução *in vivo* e a patogenicidade de 19 populações de *P. brachyurus*, provenientes de diferentes regiões geográficas do Brasil, nas culturas do milho e da soja, e observar possíveis diferenças comportamentais entre as populações do nematoide. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e duas culturas (milho e soja). A unidade experimental correspondeu a duas plantas por vaso com capacidade 2,6 L, contendo mistura solo:areia (1:1). A população inicial de nematoides foi de 2.000 espécimes por parcela experimental. Aos 60 dias após a inoculação, a população final foi analisada com as seguintes variáveis: massa seca de parte aérea (MSPA), massa fresca de raiz (MFR), número de nematoides por sistema radicular (NSR) e por grama de raiz (NGR) e fator de reprodução ($FR = Pf/Pi$). As variáveis foram submetidas a análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). Maiores e menores valores de NGR e FR foram obtidos em plantas de milho inoculadas com as populações Pb-BJe (381 nematoides por grama de raiz; $FR = 2,8$) e Pb-24 (24 nematoides por grama de raiz; $FR = 0,18$). Na soja, maiores e menores valores de NGR e FR foram obtidos com a população Pb-11 (1.582 nematoides por grama de raiz; $FR = 3,02$) e Pb-Ca (217 nematoides por grama de raiz; $FR = 0,78$). Assim, as populações Pb-BJe e Pb-16 do estado de Goiás foram mais agressivas à cultura do milho e da soja, respectivamente, de acordo com a capacidade reprodutiva dos espécimes.

Palavras-chave: agressividade, *Glycine max*, nematoide das lesões, reprodução, *Zea mays*.

Reproductive capacity of *Pratylenchus brachyurus* populations in maize and soybeans

ABSTRACT

The increase of root lesion nematode populations, *Pratylenchus brachyurus*, has caused concern in many agricultural regions of Brazil. Most commercial genotypes favor the development of the nematode, besides having resistance variation within the same specie. Thus, two experiments were conducted in a greenhouse during the period of October 2015 to January 2016. The objectives of this study were to compare *in vivo* reproduction and pathogenicity of 19 populations of the *P. brachyurus* from different regions of Brazil, in maize and soybeans and observe possible behavioral differences among populations of the nematode. The experiments were conducted in a complete randomized design with five replicates and two crops (maize and soybeans). The experimental unit corresponded to two plants per pot with a 2.6 L of capacity, containing mix soil:sand (1:1). The initial population of nematodes was 2,000 specimens per experimental plot. After 60 days of inoculation, the final population was analyzed with the following variables: dry shoot weight (DSW), fresh root weight (FRW), number of nematodes per root system (NRS) and number of nematodes per gram of roots (NGR) and reproduction factor ($RF = P_f / P_i$). The variables were subjected to analysis of variance and the means were compared by Tukey test ($P < 0.05$). Highest and lowest values of NGR and RF were obtained in maize plants inoculated with the Pb-BJE population (381 nematodes per gram of root; $RF = 2.8$) and Pb-24 (24 nematodes per gram of root; $RF = 0.18$). In soybeans, highest and lowest values of NRG and RF were obtained with the Pb-11 population (1,582 nematodes per gram of root; $RF = 3.02$) and Pb-Ca (217 nematodes per gram of root; $RF = 0.78$). Thus, the Pb-BJE and Pb-11 populations of Goiás state were more aggressive on the maize and soybeans, respectively, according to the reproductive capacity of the species.

Keywords: aggressiveness, *Glycine max*, reproduction, root lesion nematode, *Zea mays*.

1. INTRODUÇÃO

Nematoides do gênero *Pratylenchus*, conhecidos como nematoides das lesões radiculares, são considerados importantes agentes patogênicos de plantas, por apresentarem ampla distribuição mundial e vasta gama de plantas hospedeiras (CASTILLO; VOVLAS, 2007).

Ao longo da história, diferenças na gama de hospedeiros destes nematoides têm sido relatadas, estando relacionadas à reprodução *in vivo* e à patogenicidade em diversas culturas agrícolas entre as diferentes populações. Edwards e Wehunt (1973) demonstraram que populações da espécie *P. coffeae* do Panamá podem infectar milho, mas as de Honduras não. Populações da mesma espécie foram encontradas parasitando inhame na Uganda e no Pacífico, mas sendo incapazes de infectar bananeiras. Em contraste, uma população de *P. coffeae* foi encontrada parasitando ambas as culturas em Gana (BRIDGE et al., 1997).

Com base na reprodução *in vivo* de populações de *P. coffeae* em cultivares resistentes e suscetíveis de batata-doce, Mizukubo (1995) propôs a presença de raças fisiológicas entre as populações. Silva e Inomoto (2002) relataram que populações de *P. coffeae* podem apresentar variada gama de hospedeiros e sugeriram a existência de biótipos baseando-se nas diferenças de reprodução *in vivo* sobre o café e os citros. Outros estudos demonstraram diferenças na patogenicidade em inúmeras culturas entre populações de *P. coffeae* provenientes de distintas regiões geográficas (MIZUKUBO; SANO, 1997; KUBO et al., 2003; CAMPOS; VILLAIN, 2005; INOMOTO et al. 2007a). Loof (1960), também, apontou a existência de raças em *P. neglectus* da Holanda. Resultados adquiridos por Olthof (1968) identificaram duas raças de *P. penetrans* com base em sua hospedabilidade e patogenicidade sobre o tabaco e o aipo.

As diferenças nas preferências pelo hospedeiro e na capacidade de danificar tubérculos de determinadas cultivares de batata para espécie a *P. penetrans* sugeriram a existência de diferentes raças (KOTCON et al., 1987; OLTHOF; WOLYNETZ, 1991). France e Brodie (1995) confirmaram a existência de populações de *P. penetrans* que diferem na capacidade de se reproduzir em clones de batata resistentes, enquanto Mudiope et al. (2004) obtiveram resultados semelhantes para vários isolados geográficos de *P. sudanensis* em discos de cenoura.

A existência de raças dentro da espécie *P. brachyurus* foi apresentada por O'Bannon e Tomberlin (1970) após observarem variação no número de espécimes extraídos de raízes de limoeiro inoculado com diferentes populações do patógeno. As observações feitas a campo

desde a década de 90 sugerem diferenças comportamentais dentro das populações de *P. brachyurus* de regiões distintas. Menor agressividade foi observada entre três populações de *P. brachyurus* do Brasil, dos estados do Rio de Janeiro (Pb20), Bahia (Pb21) e Mato Grosso (Pb22), avaliadas em duas cultivares de algodão (MACHADO et al., 2006). Posteriormente, essas mesmas populações (Pb20 e Pb22) demonstraram variação quanto à agressividade em cultivares de feijão caupi (SIQUEIRA; INOMOTO, 2006). As diferenças na reprodução e patogenicidade observadas anteriormente corroboram com Machado et al. (2007) em cultivares de algodoeiro e Inomoto et al. (2007b) em soja e gramíneas forrageiras.

A caracterização das diferenças intraespecíficas com respeito à gama de hospedeiros, reprodução *in vivo* e patogenicidade em culturas agrícolas entre populações da mesma espécie de nematoide é importante para o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes e sustentáveis. Entre as espécies do gênero *Pratylenchus*, a espécie *P. brachyurus* vem recebendo maior destaque no Brasil, por apresentar-se amplamente disseminada, especialmente no Brasil Central (DIAS et al., 2010). O sistema de plantio direto adotado, a monocultura e a intensificação de cultivos são alguns dos fatores que têm contribuído para o aumento da importância econômica deste fitonematoide (GOULART, 2008).

O fato de *P. brachyurus* apresentar grande número de plantas hospedeiras dificulta ainda mais as estratégias de manejo (CASTILLO; VOVLAS, 2007). Desenvolver cultivares resistentes seria o ideal para possibilitar eficaz controle do patógeno (JONES; FOSU-NYARKO, 2014). A maioria dos trabalhos tem mostrado comportamento suscetível dos genótipos de soja e milho testados a *P. brachyurus* (FERRAZ, 1995; FERRAZ, 1996; COSTA; FERRAZ, 1998; INOMOTO et al., 2011). Entretanto, são escassas as informações levadas em consideração as diferenças comportamentais dentro das populações de *P. brachyurus*.

Diante disso, os objetivos do trabalho foram: comparar a reprodução *in vivo* e a patogenicidade de 19 populações de *P. brachyurus* provenientes de diferentes regiões geográficas do Brasil, sobre as culturas do milho e da soja e observar possíveis diferenças comportamentais entre as populações do nematoide.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos foram conduzidos na Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá, PR, Brasil.

2.1 Arranjo experimental e obtenção das populações

Para estudar a reprodução e patogenicidade das 19 populações de *P. brachyurus* provenientes de quatro regiões agrícolas do país (Tabela 1), foram utilizados milho cv. Al Bandeirantes e soja cv. NA7337.

Tabela 1. Origem das 19 populações de *Pratylenchus brachyurus* utilizadas no presente estudo.

Origem	Coordenadas Geográficas		Código populações
	Latitude	Longitude	
São Desidério, BA	12° 21' 48" S	44° 58' 24" W	Pb-SDe
Bom Jesus, GO	18° 12' 11" S	49° 44' 03" W	Pb-BJe
Caiapônia, GO	16° 57' 24" S	51° 48' 37" W	Pb-02
Goiatuba, GO	18° 00' 40" S	49° 22' 10" W	Pb-Go
Jataí, GO	17° 52' 53" S	51° 42' 52" W	Pb-Jat, Pb-11, Pb-16, Pb-17
Montividiu, GO	17° 26' 41" S	51° 10' 25" W	Pb-Mon
Quirinópolis, GO	18° 26' 54" S	50° 27' 06" W	Pb-Qui
Rio Verde, GO	17° 47' 53" S	50° 55' 41" W	Pb-Rv, Pb-06, Pb-09, Pb-15, Pb-24
Canarana, MT	13° 33' 08" S	52° 16' 06" W	Pb-Ca
Primavera do Leste, MT	15° 33' 32" S	54° 17' 46" W	Pb-Pva
Campo Mourão, PR	24° 02' 44" S	52° 22' 59" W	Pb-Cm
Tuneiras do Oeste, PR	23° 52' 14" S	52° 52' 34" W	Pb-22

As plântulas foram cultivadas em vasos plásticos em unidades experimentais que continham 2.600 mL de uma mistura de solo na proporção 1:1 (areia:solo), previamente esterilizado por solarização (GHINI, 1997). As sementes de milho e soja foram semeadas primeiramente em bandejas contendo areia esterilizada e, após emergência, duas plântulas saudáveis e de tamanho uniforme foram selecionadas e transplantadas em cada vaso.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com cinco repetições e 20 tratamentos (controle + 19 populações) para cada cultura.

2.2 Preparo do inóculo e inoculação

As populações de *P. brachyurus* provenientes das lavouras de soja naturalmente infestadas do país foram mantidas em plantas de milho e soja, em casa de vegetação. Para obtenção dos nematoides, as raízes foram lavadas, cortadas em pedaços de aproximadamente 1,0 cm e trituradas por cinco segundos em água com auxílio de um liquidificador, segundo a técnica proposta por Coolen e D`Herde (1972). Nas suspensões obtidas, foi estimado o número de espécimes do nematoide por mililitro sob microscópio óptico, com auxílio de lâmina de Peters.

As plântulas foram inoculadas dez dias após o transplante. Para isso, foram realizados dois orifícios a 2 cm de profundidade no solo e a 1 cm do colo de cada plântula. Em cada um deles, adicionou-se 5 ml da suspensão de nematoides, previamente calibrada, perfazendo uma população inicial (P_i) de 1000 nematoides por plântula, num total de 2000 espécimes por vaso.

2.3 Avaliações

Aos 60 dias após a inoculação, as plantas de cada unidade experimental foram retiradas dos vasos, sendo a parte aérea separada para obtenção da massa seca da parte aérea (MSPA) após secagem em estufa a 70 °C.

Os sistemas radiculares foram lavados em água corrente e as raízes foram colocadas sobre papel absorvente para a eliminação do excesso de água. Então foram pesadas, obtendo-se a massa fresca das raízes (MFR), sendo posteriormente submetidas ao método de extração de nematoides (COOLEN; D`HERDE, 1972).

Após quantificação dos nematoides obtidos no volume total das raízes, foi calculada a população final de nematoides, ou seja, o número de nematoides por sistema radicular (NSR) e o número de nematoides por grama de raiz (NGR). Para o cálculo do NGR, o número de nematoide total de cada sistema radicular foi dividido pela massa fresca de raízes. O fator de reprodução (FR), foi estimado dividindo-se a população final (P_f) pela população inicial (P_i) (OOSTENBRINK, 1966).

2.4 Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e ao Teste de Scott-knott a 5% de probabilidade por comparações múltiplas, com o auxílio do programa estatístico Sisvar.

3. RESULTADOS

Nas avaliações aos 60 dias após a inoculação (Tabela 2), as populações *P. brachyurus* oriundas de Bom Jesus (Pb-Bje), Campo Mourão (Pb-Cm), Canarana (Pb-Ca), Jataí (Pb-11 e Pb-17), Montividiu (Pb-Mon), Primavera do Leste (Pb-Pva), Quirinópolis (Pb-Qui), Rio Verde (Pb-15), São Desidério (Pb-SDe) e Tuneiras do Oeste (Pb-22) não reduziram a massa seca da parte aérea (MSPA) do milho, quando comparadas com o controle. Entretanto, as populações de Caiopônia (Pb-02), Goiatuba (Pb-Go), Jataí (Pb-Jat, Pb-16), Rio Verde 9 Pb-Rv, Pb-06, Pb-09 e Pb-24) afetaram negativamente a MSPA, resultando em menor acúmulo. No experimento com soja, as populações de Canarana (Pb-Ca) e Tuneiras do Oeste (Pb-22), bem como as populações de Caiopônia (Pb-02), Jataí (Pb-16), Rio Verde (Pb-06, Pb-09 e Pb-24), Montividiu (Pb-Mon) e Primavera do Leste (Pb-Pva) também afetaram negativamente a MSPA quando comparada ao controle.

As populações de *P. brachyurus* coletadas em Bom Jesus (Pb-Bje), Goiatuba (Pb-Go), Jataí (Pb-Jat e Pb-16) e Rio Verde (Pb-09 e Pb-24), afetaram significativamente a massa fresca das raízes (MFR), se comparadas ao controle no experimento com milho. No entanto, as demais populações não diferiram estatisticamente entre si e o controle (Tabela 2). No experimento com soja, os melhores incrementos radiculares foram observados no controle e nas populações de Campo Mourão (Pb-Ca), Goiatuba (Pb-Go), Jataí (Pb-Jat e Pb-17), Quirinópolis (Pb-Qui), Rio Verde (Pb-15) e São Desidério (Pb-Dse). As populações de Bom Jesus (Pb-Bje), Jataí (Pb-16) e Rio Verde (Pb-09 e Pb-24) apresentaram menores incrementos radiculares tanto no milho quanto na soja (Tabela 2). Foram observados sintomas visuais de escurecimento nas raízes de soja inoculadas com o nematoide.

Todas as populações de *P. brachyurus* utilizadas no estudo foram capazes de infectar e se reproduzir nas raízes das cultivares de milho e soja analisadas e diferenças foram observadas quanto à capacidade reprodutiva entre as 19 populações do nematoide (Tabela 3).

Para o milho, a menor densidade populacional de nematoides por sistema radicular (NSR) foi obtida quando inoculado com a população de Rio Verde (Pb-24), com média de 356 nematoides, diferindo estatisticamente das demais populações (Tabela 3).

Tabela 2. Massa seca da parte aérea (MSPA) e massa fresca das raízes (MFR) de milho cv. A1 Bandeirantes e soja cv. NA7337 aos 60 dias após a inoculação com 2000 espécimes de diferentes populações de *Pratylenchus brachyurus*.

População	Milho		Soja	
	MSPA (g)	MFR (g)	MSPA (g)	MFR (g)
Pb-BJe	5,70 a	16,92 b	4,04 b	9,14 b
Pb-02	3,64 b	25,03 a	3,44 c	7,80 b
Pb-Cm	4,88 a	21,80 a	5,05 a	11,87 a
Pb-Ca	4,98 a	20,23 a	2,23 d	8,62 b
Pb-Go	3,26 b	16,95 b	4,64 a	11,41 a
Pb-Jat	4,28 b	18,84 b	4,73 a	9,99 a
Pb-11	5,30 a	21,55 a	4,07 b	9,47 b
Pb-16	4,01 b	13,93 b	3,81 c	8,73 b
Pb-17	5,36 a	23,64 a	4,34 b	10,49 a
Pb-Mon	4,61 a	19,87 a	3,55 c	8,91 b
Pb-Pva	4,78 a	19,83 a	3,73 c	8,59 b
Pb-Qui	5,04 a	21,85 a	4,49 a	10,51 a
Pb-Rv	3,60 b	22,85 a	4,45 a	9,14 b
Pb-06	3,97 b	21,83 a	3,35 c	8,18 b
Pb-09	4,04 b	18,00 b	3,34 c	7,33 b
Pb-15	5,12 a	25,08 a	4,74 a	10,96 a
Pb-24	2,60 b	16,00 b	3,57 c	8,99 b
Pb-SDe	4,57 a	21,14 a	4,73 a	10,31 a
Pb-22	5,23 a	21,35 a	2,01 d	8,00 b
Controle	4,42 a	20,97 a	4,00 b	10,05 a
CV (%)	12,75	19,23	13,92	12,82

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-knott ($P < 0,05$). CV(%): coeficiente de variação.

Diferenças quanto às populações, também, foram observadas no cultivo da soja. As população de Canarana (Pb-Ca) e Rio Verde (Pb-09) apresentaram menores valores de nematoide por sistema radiculares, com média de 1.554 e 2.246 nematoides, respectivamente. Enquanto que as populações de Goiatuba (Pb-Go), Jataí (Pb-16), Primaveiras do leste (Pb-Pva) e Rio Verde (Pb-15 e Pb-24) mostraram maiores reproduções quando avaliado o número de NSR (Tabela 3).

Os dados ainda relacionados à reprodução no milho, expressos em número de nematoides por grama de raiz (NGR) foram estatisticamente significativo, sendo que menor valor de NGR (23,9) foi observado na população de Rio verde (Pb-24). Da mesma forma, menor fator de reprodução (FR) também foi observado na população Pb-24 com índice de

0,42. Enquanto que as populações de Bom Jesus (Pb-Bje) e Primavera do Leste (PB-Pva) apresentaram os maiores índices de FR com 2,81 e 2,15, respectivamente (Tabela 3).

Quanto à soja, os valores de NGR também foram estatisticamente diferentes. Sendo que as populações de Campo Mourão (Pb-Cm), Canarana (Pb-Ca), Jataí (Pb-Jat e Pb-17), Montividiu (Pb-Mon), Quirinópolis (Pb-Qui), Rio Verde (Pb-06 e Pb-09) e São Desidério (Pb-SDe) apresentaram menores valores em relação as demais populações. O menor FR foi obtido para a população de Canarana (Pb-Ca) com índice de 0,78. Enquanto que os maiores índices do FR foram de 4,41 para a população de Jataí (Pb-16) e de 4,33 na população de Goiatuba (Pb-Go) (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito sobre o número total de nematoides recuperados por sistema radicular (NSR), número de nematoides por grama de raiz (NGR) e fator de reprodução (FR) de *Pratylenchus brachyurus* em cultivares de milho e soja aos 60 dias após a inoculação.

População	Milho			Soja		
	NSR	NGR	FR (Pf/Pi)	NSR	NGR	FR (Pf/Pi)
Pb-BJe	5.626 b	381,4 c	2,81	5.424 c	717,2 b	2,71
Pb-02	3.610 b	154,7 b	1,81	5.910 c	981,0 b	2,96
Pb-Cm	3.747 b	180,5 b	1,87	3.654 b	396,0 a	1,83
Pb-Ca	2.152 b	120,4 b	1,08	1.554 a	216,7 a	0,78
Pb-Go	3.528 b	250,9 c	1,76	8.666 d	921,6 b	4,33
Pb-Jat	4.032 b	237,7 c	2,02	4.384 b	533,2 a	2,19
Pb-11	2.702 b	147,4 b	1,35	6.054 c	1582,7 b	3,03
Pb-16	3.990 b	316,8 c	2,00	8.824 d	1136,5 b	4,41
Pb-17	2.986 b	138,1 b	1,49	3.654 b	645,4 a	2,29
Pb-Mon	3.172 b	187,7 b	1,59	3.808 b	612,5 a	1,90
Pb-Pva	4.298 b	234,3 c	2,15	7.078d	942,1 b	3,54
Pb-Qui	3.006 b	143,3 b	1,50	4.692 b	566,1 a	2,35
Pb-Rv	3.016 b	142,1 b	1,51	6.248 c	803,5 b	3,12
Pb-06	3.380 b	169,7 b	1,69	3.982 b	578,4 a	1,99
Pb-09	3.284 b	231,3 c	1,64	2.246 a	348,9 a	1,12
Pb-15	2.874 b	120,3 b	1,44	7.892 d	942,7 b	3,95
Pb-24	356 a	23,9 a	0,18	7.258 d	908,1 b	3,63
Pb-SDe	2.686 b	141,5 b	1,34	3.926 b	486,0 a	1,96
Pb-22	3.586 b	172,6 b	1,79	5.768 c	1012,3 b	2,88
CV (%)	21,48	24,47	-	17,43	23,43	-

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-knott ($P < 0,05$). As variáveis foram transformadas em raiz quadrada pela transformação Box-Cox. CV(%): coeficiente de variação.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos experimentos confirmam que as culturas do milho e da soja permitiram a reprodução de *P. brachyurus*, isso devido às características agronômicas de cada espécie, pois se sabe que ambas as culturas são hospedeiras do nematoide, ou seja, permitem que o nematoide se abrigue, alimente e reproduza no interior dos tecidos radiculares das plantas (INOMOTO, 2008).

A maioria das populações estudadas apresentou variações comportamentais em relação aos hospedeiros. As populações de Bom Jesus (Pb-BJe) e Rio Verde (Pb-24) apresentaram maiores e menores valores de FR no milho. Por outro lado, na soja, o maior FR foi observado para a população de Jataí (Pb-16), oriundade Goiás, e o menor para a população de Canarana (Pb-Ca), no Mato Grosso. Entretanto, a um ponto a ser observado em relação ao número de nematoide por sistema radicular no experimento com soja, sendo que as populações de Canara (Pb-Ca) e Rio Verde (Pb-09) não diferiram estatisticamente entre si. Ao analisar o FR, somente a população PB-Ca apresentou $FR < 1$. De acordo com Inomoto et al. (2007b), a variável FR apresenta maior validade para entender o comportamento de parasitismo do nematoide nas plantas, pois representa o efeito da cultura no aumento populacional ou na sua supressão. Essa observação mostra as variáveis FR ou NSR nem sempre são equivalentes.

Diferenças de agressividade entre as populações de fitonematoides, também, influenciam a patogenicidade e a multiplicação destes patógenos, interferindo na reação dos genótipos. Essa diferença pode ser observada tanto em estudos conduzidos em ambientes controlados como em áreas naturalmente infestadas. Payan e Dickson (1988) já haviam observado variações em quatro populações de *P. brachyurus* obtidas de diferentes hospedeiros, quanto ao número de espécimes extraídos de raízes de alfafa, amendoim, citros, feijão, milho, soja e tomate de distintas regiões geográficas dos Estados Unidos (Flórida, Geórgia e Carolina do Norte), avaliadas quanto à capacidade reprodutiva pelo número de nematoides por grama de raiz. Sob condições de casa de vegetação, três populações de *P. brachyurus* provenientes de raízes de quiabeiro do município de Seropédica – RJ, denominada Pb20, e de lavouras de algodão de Serra do Ramalho - BA e Campo Verde - MT, Pb21 e Pb22, respectivamente, mostraram-se pouco agressivas às duas cultivares de algodão, não apresentando diferenças significativas caracterizadas pelo FR (MACHADO et al., 2006). Contudo, as populações Pb20 e Pb21 foram usadas em outro estudo, desta vez usando seis

cultivares de feijão caupi, e apresentaram diferença na agressividade, caracterizadas pelo maior número NGR e FR para o isolado Pb21 (SIQUEIRA; INOMOTO, 2006). Tais resultados encontram concordância nas observações posteriores, quando se estudou a agressividade de Pb20 e Pb22 a 15 cultivares de algodão, para as quais a população Pb22 mostrou-se mais agressiva, maiores valores de FR e NGR, constatando-se ainda graus variáveis de agressividade para as diferentes cultivares de algodão em termos de FR (MACHADO et al., 2007).

Inomoto et al. (2007b), objetivando avaliar a reação hospedeira da soja e gramíneas forrageiras a duas populações de *P. brachyurus* (Pb20 utilizada nos estudos anteriores; e Pb24 do município de Itiquira - MT), constataram que a população Pb24 apresentou maior afinidade com a soja, *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha* em comparação a população Pb20, verificando indícios de variação de agressividade, reforçando os resultados obtidos pelos trabalhos anteriores.

É importante mencionar que os resultados de variação na capacidade reprodutiva e agressividade de diferentes populações de *Pratylenchus* spp. têm sido observados em outros patossistemas (FRANCE; BRODIE, 1995; INOMOTO et al., 2007a; MUDIOPE et al., 2004). Desta forma, é possível inferir que os genótipos de milho e soja disponíveis no mercado diferem com relação a capacidade de multiplicar ou tolerar *P. brachyurus*. Além disto, os resultados alcançados neste estudo e pelos demais pesquisadores apoiam a ideia de que populações de *P. brachyurus* variam em sua agressividade em relação à algumas culturas e que a origem de cada população pode desempenhar importante papel nesta variação (MACHADO et al., 2007).

5. CONCLUSÃO

- a) As populações de *P. brachyurus* estudadas apresentaram variações comportamentais nas culturas do milho e soja.
- b) A população de Rio Verde (Pb-24) apresentou menor fator de reprodução na cultura do milho, enquanto que as maiores índices foram observados na população de Bom Jesus (Pb-Bje) e Primavera do Leste (Pb-Pva).
- c) A população de Canarana (Pb-Ca) apresentou menor fator de reprodução na cultura da soja, enquanto que as maiores índices foram observados na população de Goiatuba (Pb-Go) e Jataí (Pb-16).

6. REFERÊNCIAS

- BRIDGE, J.; FOGAIN, R.; SPEIJER, P. The root lesion nematodes of banana: *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann, 1898) Filipjev and Schuurmans Stekhoven 1941. *Pratylenchus goodeyi* Sher and Allen, 1953. Musa Pest Fact Sheet No. 2. **International network for the improvement of banana and plantain (INIBAP)**, Montpellier, France, 4 p, 1997.
- CAMPOS, V. P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee and cacao. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (ed.). **Plant-parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture (2nd edition)**. Wallingford, UK: CAB International, p. 529-580, 2005.
- CASTILLO, P.; VOVLAS, N. *Pratylenchus* (Nematoda: *Pratylenchidae*): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management. **Nematology Monographs and Perspectives**. v. 6, 2007. 529p.
- COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. **State Nematology and Entomology Research Station**, p. 72, 1972.
- COSTA, D. C.; FERRAZ, S. Avaliação da resistência de cultivares e linhagens de soja a *Pratylenchus brachyurus*. **Nematologia Brasileira**, v.13, p. 4-5, 1998.
- DIAS, W. P.; GARCIA, A.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. E. de S. **Nematoides em soja: identificação e controle**. Londrina: Embrapa Soja, 8 p. Circular Técnica 76. 2010.
- EDWARDS, D. I.; WEHUNT, E. J. Hosts of *Pratylenchus coffeae* with additions from Central American banana producing areas. **Plant Disease Reporter**, v. 57, p. 47- 50, 1973.
- FERRAZ, L. C. C. B. Patogenicidade de *Pratylenchus brachyurus* a três cultivares de soja. **Nematologia Brasileira**, v. 19, p. 1-8, 1995.
- FERRAZ, L. C. C. B. Reações de genótipos de soja a *Pratylenchus brachyurus*. **Nematologia Brasileira**, v. 20, p. 22-31, 1996.
- FRANCE, R. A.; BRODIE, B. B. Differentiation of two New York isolates of *Pratylenchus penetrans* based on their reaction on potato. **Journal of Nematology**, v.27, p. 339-345, 1995.
- GHINI, R. **Desinfestação do solo com o uso de energia solar: solarização e coletor solar**. Jaguariúna: Embrapa – CNPDA, 29 p. Circular Técnica 1. 1997.
- GOULART, A. M. C. **Aspectos gerais sobre nematoides das lesões radiculares (Gênero *Pratylenchus*)**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 30 p. Documentos 219. 2008.

INOMOTO, M. M.; KUBO, R. K.; SILVA, R. A.; OLIVEIRA, C. M. G.; TOMAZINI, D.; MAZZAFERA, P. Pathogenicity of two *Pratylenchus coffeae* populations from Brazil on coffee plants. **Nematology**, v. 9, p. 853-858, 2007a.

INOMOTO, M. M.; MACHADO, A. C. Z.; ANTEDOMENCIO, S. R. Reação de *Brachiaria* spp. e *Panicum maximum* a *Pratylenchus brachyurus*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 341-344, 2007b.

INOMOTO, M. M. Importância e manejo de *Pratylenchus brachyurus*. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, 8 ed., nov./dez. 2008. Disponível em: <<http://www.plantiodireto.com.br>>. Acesso em: 12/02/2016.

INOMOTO, M. M. Avaliação da resistência de 12 híbridos de milho a *Pratylenchus brachyurus*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 308-312, 2011.

JONES, M. G. K.; FOSU-NYARKO, J. Molecular biology of root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) and their interaction with host plants. **Annals of Applied Biology**, v. 164, p.163-181, 2014.

KOTCON, J. B.; LORIA, R.; WIXTED, D. J. *Pratylenchus penetrans* populations dynamics on three potato cultivars. **Journal of Nematology**, v. 19, p. 361-368, 1987.

KUBO, R. K.; SILVA, R. A.; TOMAZINI, M. D.; OLIVEIRA, C. M. G.; MAZZAFERA, P.; INOMOTO, M. M. Patogenicidade de *Pratylenchus coffeae* em plântulas de cafeeiro cv. Mundo Novo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 41-48, 2003.

LOOF, P. A. A. Taxonomic studies on the genus *Pratylenchus*(Nematoda). **Tijdschrift over Plantenziekten**, v.66, p. 29-90, 1960.

MACHADO, A. C. Z.; BELUTI, D. B.; SILVA, R. A.; SERRANO, M. A. S.; INOMOTO, M. M. Avaliação de danos causados por *Pratylenchus brachyurus* em algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 11-16, 2006.

MACHADO, A. C. Z.; FERRAZ, L. C. C. B.; INOMOTO, M. M. Response of cotton cultivars to two Brazilian populations of *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev & Sch. Stekh. **The Journal of Cotton Science**, v. 11, p. 288-292, 2007.

MIZUKUBO, T. Evidence for *Pratylenchus coffeae* races in differential reproduction on fifteen cultivars (Nematoda: Pratylenchidae). **Japanese Journal of Nematology**, v. 25, p. 85-93, 1995.

MIZUKUBO, T.; SANO, Z. Research paper: *Pratylenchus coffeae* virulent races in sweet potato. **Sweet potato Research Front**, 2p. 1997.

MUDIOPE, J.; COYNE, D. L.; ADIPALA, E.; SIKORA, R. A. Monoxenic culture of *Pratylenchus sudanensis* on carrot disks, with evidence of differences in reproductive rates between geographical isolates. **Nematology**, v. 6, p. 617-619, 2004.

O'BANNON, J. H.; TOMBERLIN, A. T. *Pratylenchus* sp. as citrus pathogens. *Phytopathology*, v. 60 p. 1540 (Abstr.), 1970.

OLTHOF, T. H. A. Races of *Pratylenchus penetrans*, and their effect on black root rot resistance of tobacco. **Nematologica**, v.14, p. 482-488, 1968.

OLTHOF, T. H. A.; WOLYNETZ, M. S. *Pratylenchus penetrans* and *P. neglectus* in tubers of potato (*Solanum tuberosum*) in Ontario. **Canadian Journal of Plant Science**, v.71, p. 1251-1256, 1991.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mendelingen Landbouwhogeschool**, v. 66, p. 1-46, 1966.

PAYAN, L. A.; DICKSON, D. W. Host specificity of four populations of *Pratylenchus brachyurus*. **Annual Applied Nematology**, v. 2, p. 140-143, 1988.

SILVA, R. A.; INOMOTO, M. M. Host-range characterization of two *Pratylenchus coffeae* populations from Brazil. **Journal of Nematology**, v. 34, p. 135-139, 2002.

SIQUEIRA, K. M. S.; INOMOTO, M. M. Reação de genótipos de feijão de corda (*Vigna unguiculata*) a isolados de *Pratylenchus brachyurus*. *Nematologia Brasileira*, v. 30 (1):125, 2006 (Resumo).

VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. **Modern applied statistics with S**. 4th ed. New York: Springer, 2002. 495p.

CAPÍTULO 3

Mortalidade de *Pratylenchus brachyurus* durante estresse da dessecação e capacidade infectiva de espécimes sobreviventes em milho e soja pós-dessecação

Mortalidade de *Pratylenchus brachyurus* durante estresse da dessecação e capacidade infectiva de espécimes sobreviventes em milho e soja pós-dessecação

RESUMO

A sobrevivência de *Pratylenchus brachyurus* depende de raízes de hospedeiros remanescentes nas lavouras, além de plantas invasoras e voluntárias, contudo são poucas as informações a respeito da permanência e longevidade deste parasita. Assim, o trabalho teve como objetivo avaliar a mortalidade e capacidade infectiva de *P. brachyurus* em solo artificialmente infestado, bem como os efeitos da dessecação do solo sobre o nematoide. O primeiro experimento foi delineado para mortalidade em esquema fatorial 3 x 2 x 4. O primeiro fator foi planta hospedeira (controle - sem planta, milho e soja), o segundo fator, tipo de inoculação (suspensão e raízes infectadas), e o terceiro fator, período de armazenamento (30, 60, 90 e 120 dias). No segundo experimento avaliou-se a penetração em esquema fatorial 2 x 2 x 4, sendo o primeiro fator tipo de hospedeiro (milho e soja), e o segundo e terceiro fatores mesmos fatores do estudo sobre mortalidade. Aproximadamente 4000 espécimes foram adicionados para ambos os tipos de inoculação. Após 30, 60, 90 e 120 dias da inoculação foi realizado o cultivo de plantas suscetíveis com o objetivo de avaliar a mortalidade dos nematoides no solo e a capacidade infectiva dos espécimes sobreviventes. Sob os critérios de Informação de Akaike (AIC), razão de verossimilhança (LR) e Vuong, as plantas de milho ou soja inoculadas através do método de suspensão foram responsáveis por maior mortalidade de *P. brachyurus* quando comparado com o método de raízes infectadas. Os nematoides sobreviventes foram capazes de infectar as raízes do hospedeiro, independente do tipo de inoculação. Observou-se estado anidrobiótico aos 90 e 120 dias.

Palavras-chave: Anidrobiose. *Glycine Max*. Nematoide das lesões radiculares. *Zea mays*.

Mortality of *Pratylenchus brachyurus* during desiccation stress and infective capacity of survivors specimens in maize and soybean pos desiccation

ABSTRACT

The survival of *Pratylenchus brachyurus* depends remaining hosts roots in fields, besides weeds and volunteer plants, however, there is little information about the permanence and longevity of this parasite. The objectives of this study were to evaluate the mortality and infective capacity of the nematode in artificially infested soil, and the effects of soil desiccation on the nematode. The first experiment evaluated the mortality and it was conducted in a complete randomized design with a factorial arrangement (3 x 2 x 4). The first factor was host plant (control - without plant, maize and soybean), the second factor was type of inoculation (suspension and roots infected), and the third factor was storage periods (30, 60, 90 and 120 days). The second experiment evaluated the penetration in a factorial arrangement (2 x 2 x 4), first factor was host palnt (maize and soybean), second and third factors were the same factors in the mortality study. Total 4000 specimens were added for both types of inoculation. After 30, 60, 90 and 120 days of inoculation the substrate were carried out of the cultivation of susceptible plants with the aim of evaluating nematodes of soil and the infective capacity of the surviving specimens. Under the test of Akaike Information Criterion (AIC), Likelihood Ratio (LR) and Vuong, the plants of maize or soybeans inoculated by suspension method resulted higher mortality of *P. brachyurus* than the infected roots inoculation. The nematodes survivor was able to infect the roots of the host, regardless of the type of inoculation. Anhidrobiotic state was observed at 90 and 120 days.

Keywords: Anhidrobiosis. *Glycine max.* *Zea mays.* Root lesion nematode.

1. INTRODUÇÃO

Nematoides fitoparasitas estão entre os quatro principais grupos de patógenos de plantas em termos de perdas econômicas na agricultura. De fato, *Pratylenchus* spp. foram considerados o terceiro grupo depois do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) e nematoides de cisto (*Heterodera* spp. e *Globodera* spp.) (JONES; FOSU-NYARKO, 2014).

Pratylenchus brachyurus (Godfrey, 1929) Filipjev & Schuurmanns Stekhoven 1941 é reconhecido como um dos principais patógenos nas culturas de grande importância econômica, tais como o milho e a soja. A distribuição das populações do nematoide no campo depende das interações entre fatores bióticos, abióticos e práticas agrônômicas realizadas durante os estádios de crescimento da planta. O plantio direto adotado em alguns países tem contribuído para a manutenção das populações do patógeno no campo, e, além disso, o milho é uma cultura muito utilizada na rotação de culturas com a soja no Brasil, sendo considerado também como boa hospedeira do nematoide (DIAS-ARIEIRA et al., 2012).

Reduções na densidade populacional de *P. brachyurus* ocorrem sazonalmente no período de entressafra, porém, a sobrevivência do nematoide é assegurada através da permanência de raízes de milho e soja remanescentes no campo, bem como plantas daninhas e voluntárias. No entanto, após a degradação das raízes, o nematoide permanecerá no solo e a sua longevidade dependerá das reservas alimentares acumuladas (INOMOTO, 2008) e da umidade do solo (McSORLEY, 2003).

Embora a baixa umidade possa reduzir a atividade e os níveis populacionais de patógenos (PERRY; MOENS, 2011), organismos tais como os nematoides parasitas de plantas desenvolveram mecanismos para detectar e responder às flutuações nas condições ambientais, especialmente quando interferem no ciclo de vida, gerando condições de estresse (WANG et al., 2009). Este fenômeno é conhecido como criptobiose e apresenta-se de diversas formas, como anidrobiose (na seca), criobiose (no frio) ou anoxibiose (sem oxigênio) (KEILIN, 1959, citado por ERKUT; KURZCHALIA, 2015).

Anidrobiose é um estágio fisiológico de dormência induzida pela dessecação, caracterizado pela redução drástica do metabolismo do nematoide, cessando o movimento e a alimentação (EVANS; PERRY, 1976). Os mecanismos envolvidos na anidrobiose incluem a redução da permeabilidade da cutícula e agrupamento de tecidos e organelas, sendo que algumas espécies de nematoides podem aumentar a produção de açúcares não-redutores, tais como a trealose (WATANABE, 2006), que estabilizam moléculas (lipídios de membrana e

proteínas) dentro de células (CROWE, 2002), preservando a integridade estrutural, apesar de toda a perda de água do corpo (ERKUT; KURZCHALIA, 2015).

Com base em estudos, nematoides enrolam seus corpos em resposta à dessecação (TREONIS; WALL, 2005; OTSUBO et al., 2006; TSAI, 2008; NEVES et al., 2012). Enrolamento é uma resposta comportamental à desidratação, através da contração da cutícula e músculos, os quais reduzem a área de superfície quando o nematoide é exposto à condições de secagem (PERRY; MOENS, 2011).

Várias espécies do gênero *Pratylenchus* desenvolveram habilidade para permanecerem ativos por um longo período no solo ou raízes na forma anidrobiótica, como já ocorreu para *P. penetrans* (Cobb, 1917) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 (TOWNSHEND, 1984), *P. thornei* Sher & Allen 1953, *P. mediterraneus* Corbett, 1983 (GLAZER; ORION, 1983), *P. coffeae* (Zimmermann, 1898) Filipjev & Schuurmans Stekhoven de 1941 (TSAI, 2008), *P. jordanensis* Hashim, 1983 (MANI, 1999) e *P. brachyurus* (FELDMESSER et al., 1960; NEVES et al., 2012). Contudo, são poucas as informações a respeito da permanência e longevidade de *P. brachyurus*.

Neste sentido, o presente estudo teve como objetivos: i) determinar a mortalidade de *P. brachyurus* na presença e ausência de planta hospedeira em solo artificialmente infestado com dois tipos de inoculação e submetidos a diferentes períodos de escassez de umidade; ii) avaliar a capacidade de penetração do nematoide durante o período de escassez de umidade; iii) observar os efeitos da dessecação na mobilidade, postura e sobrevivência do nematoide.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no período de janeiro a maio de 2013 na Universidade de Rio Verde, Rio Verde, Goiás, Brasil. Para avaliar a mortalidade de *P. brachyurus*, cada parcela foi constituída por um recipiente plástico com capacidade de 200 cm³ contendo substrato e inóculo de *P. brachyurus* (suspensão líquida ou raízes infectadas). O substrato utilizado foi areia e solo na proporção de 2:1 (v:v), com porcentagens de 70, 5 e 25% para areia, silte e argila, previamente desinfestados por solarização (GHINI, 1997). Os recipientes foram armazenados em sala climatizada a 25 °C, sem irrigação, em seus respectivos períodos de repouso.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com arranjo fatorial 3x2x4. O primeiro fator foi o tipo de planta hospedeira (controle - sem planta, milho e soja). O segundo fator, tipo de inoculação (suspensão e raízes infectadas) e o terceiro fator, períodos de armazenamento (30, 60, 90 e 120 dias). Foram realizadas seis repetições, totalizando 144 unidades experimentais (parcelas).

O outro experimento avaliou a penetração do nematoide em plantas hospedeiras. Para isso, foi utilizado o um delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial 2x2x4 com seis repetições. Foram considerados no primeiro fator dois tipos de planta hospedeira (milho e soja). O segundo e terceiro fator foram os mesmos do experimento de mortalidade. Foram avaliados um total de 96 unidades experimentais (parcelas).

2.2 Preparo do inóculo e inoculação

A população de *P. brachyurus* utilizada foi obtida a partir de lavoura comercial de soja da cidade de Rio Verde, Goiás, Brasil (17°47'53 "S e 50°55'41" O). Foram utilizados dois tipos de métodos de inoculação: suspensão líquida e raízes infectadas.

Para obter o inóculo da suspensão líquida, as raízes foram lavadas e cortadas em pedaços de aproximadamente 2,0 cm de acordo com a metodologia de Coolen e D'Herde (1972). Com as suspensões obtidas, a densidade de inóculo foi previamente calibrada em lâmina de Peters e 5 mL de suspensão contendo 4.000 espécimes de *P. brachyurus* foram inoculados em cada parcela. Para o segundo método de inoculação, as raízes foram cortadas

em pedaços de 3 cm e misturadas em meio ao substrato. Uma alíquota foi submetida ao processo de extração, onde foram quantificados aproximadamente 1.143 nematoides por grama de raiz. Foram, então, adicionados 3,5 g de raiz, num total de 4.000 nematoides, em cada parcela.

Após 30, 60, 90 e 120 dias da inoculação do substrato foi realizado o cultivo de plantas suscetíveis com o objetivo de avaliar os nematoides do solo e a capacidade infecciosa dos espécimes sobreviventes. Para tal, sementes de soja cultivar NA 7337 e milho VT Pro2 foram superficialmente desinfestadas com hipoclorito de sódio (1%) por um minuto, germinadas em bandejas contendo areia grossa umedecida e mantidas em sala climatizada a 25 °C. Três dias depois, uma plântula (com radícula de 3 cm), foi transplantada na respectiva unidade experimental. Unidades que receberam as plantas foram mantidas em estufa e irrigadas duas vezes ao dia.

2.3 Análise dos dados

Após 30 dias de cada período de armazenarmento, os nematoides remanescentes no solo de cada recipiente foram extraídos utilizando centrifugação (JENKINS, 1964). Para avaliar a penetração, as raízes foram recolhidas, lavadas, pesadas e os nematoides foram extraídos utilizando-se a metodologia de Coolen e D`Herde (1972). Finalmente, cada suspensão foi quantificada utilizando lâmina de Peters em microscópio de objetiva invertida, determinando assim o número total de *P. brachyurus* sobreviventes em cada unidade experimental. A mortalidade foi determinada usando a equação P_i (população inicial) - P_f (população final).

Uma abordagem de modelagem linear generalizada foi utilizada para análise de variância, avaliando-se os principais efeitos e interações na mortalidade e penetração de *P. brachyurus*. Cada variável foi analisada com algumas diferenças, para mortalidade o modelo ajustado para os dados pode ser escrito como:

$$y_{ijk} = \alpha_0 + \alpha_1 * tempo_i + \beta_{j_i} + \gamma_{k_i} + (\beta\gamma)_{jk_i}$$

Em que Y_{ijk} corresponde a cada observação em i -ésimo período de tempo, j -ésimo tratamento e k -ésimo tipo de inoculação; α_0 é a média geral; α_1 é o efeito quantitativo tempo

(30, 60, 90 e 120), β_j é o efeito do tratamento (controle, milho e soja); γ_k é o efeito do tipo de inoculação a partir de $j = 1$ e 2 ; $(\beta\gamma)_{jk}$ é o efeito da interação entre tratamento e inoculação.

Para modelar a distribuição da mortalidade de *P. brachyurus*, um modelo de regressão de Poisson com função de ligação *log* foi implementada no procedimento GLIMMIX do SAS. Um componente sistemático do modelo de Poisson:

$$y_{ijk} = \alpha_0 + \alpha_1 * tempo_i + \beta_{j_i} + \gamma_{k_i} + (\beta\gamma)_{jk_i}$$

O componente aleatório do modelo de Poisson: $y_{ijk} \square Poisson(\lambda_{ijk})$

Função de ligação do modelo de Poisson: $\eta_{ijk} = \log(\lambda_{ijk})$

Resumidamente, o modelo de regressão de Poisson não foi prosseguido porque foi confirmada superdispersão nos dados, com a variância da variável resposta maior que a média (Tabela 1). Neste caso, a suposição de distribuição de Poisson para variável resposta é inadequada, sendo necessário o uso de modelos alternativos.

Tabela 1. Média, variância, mínimo (Min) e máximo (Max) das variáveis resposta: mortalidade e penetração por nível categórico (tratamentos e inoculação) e preditor quantitativo (tempo).

Efeitos	Nível	Mortalidade				Penetração			
		Média	Variância	Min	Max	Média	Variância	Min	Max
Tratamentos	Controle	3222,04	372134,51	2000	3856	-	-	-	-
	Milho	3967,98	2119,17	3800	4000	115,85	26587,28	0	792
	Soja	3932,88	23947,69	2926	4000	96,92	16099,52	0	475
Tempo (dias)	30	3619,64	302328,07	2104	3964	207,25	45719,15	35	792
	60	3849,64	41396,18	3215	3983	183,5	12301,91	12	384
	90	3616,44	419418,94	2000	4000	70,5	6407,39	0	234
	120	3744,81	218819,13	2341	4000	9,29	302,3	0	58
Inoculação	Suspensão	3865,76	33631,59	2926	4000	30,6	1962,67	0	180
	Raízes infectadas	3549,50	418786,25	2000	4000	182,17	29177,29	0	792

Um modelo binomial negativo (BN), que também é específico para as variáveis resposta do tipo de contagem, foi considerado como uma alternativa para a distribuição de Poisson. Neste modelo alternativo, o componente aleatório do modelo BN foi:

$y_{ijk} \square Negative\ binomial(\mu_{ijk}, \phi)$ e todas as fontes de variação e efeitos foram mantidos os mesmos como no modelo de Poisson. Por conseguinte, a sistemática e função de ligação do modelo BN foram os mesmos do que de Poisson. Modelo BN com função de ligação *log* foi implementada no procedimento GLIMMIX do SAS.

Os testes padrões “Goodness-of-fit” incluíram Chi-quadrado de Pearson e Chi-quadrado de Pearson Generalizado / GL, utilizados para avaliar o modelo de melhor ajuste, resumindo a discrepância existente entre os valores esperados pelo modelo em questão e os valores observados correspondentes (McCULLAGH; NELDER, 1989) (Tabela 2).

Tabela 2. “Goodness-of-fit” dos modelos estatísticos binomial negativo (BN) e Poisson para mortalidade e distribuição de Poisson e Poisson Inflacionado de Zero (ZIP) para os modelos de comparação para penetração de *Pratylenchus brachyurus*.

Parâmetros overdispersão	Mortalidade			Penetração				
	BN	GL ^a	Poisson	GL	Poisson	GL	ZIP	GL
Chi-quadrado de Pearson	143,38		2703,16		4188,67		179,06	
Chi-quadrado generalizado/GL ^b	1,05	137	19,73	137	47,06	91	1,99	90

^a GL=grau de liberdade.

^b Menor valor do Qui-quadrado generalizado/GL indica melhor ajuste do modelo BN comparado com Poisson para mortalidade, e ZIP melhor modelo que Poisson para penetração.

Além disso, para encontrar o melhor modelo, foram testados os modelos de Poisson e BN usando Vuong (VUONG, 1989) e AIC (Akaike Information Criterion). A significância e valor positivo dos testes estatísticos indicam que esse modelo escolhido é o melhor (Tabela 3). Esta análise foi realizada na *%macro Vuong* do SAS (VUONG, 1989).

Tabela 3. Critérios de seleção do modelo preferido para mortalidade e penetração de *Pratylenchus brachyurus*.

Variável	Modelo	Log-Likelihood	AIC	Teste de Vuong
Mortalidade	BN	-1326,26	-48,0000	Modelo preferido
	Poisson	-1151299,9	-20,6787	Modelo não preferido
Penetração	ZIP	-1704,94	4,4597	Modelo preferido
	Poisson	-2392,68	12,0000	Modelo não preferido

A penetração foi avaliada em primeiro lugar com distribuição de Poisson e função de ligação *log*, e em seguida com modelo de Poisson inflacionado de zero (ZIP) com função de ligação *log* para comparação dos modelos. Modelo de Poisson para penetração foi o mesmo utilizado para mortalidade. De fato, o modelo estatístico que representa o experimento foi o seguinte:

$$y_{ijk} = \alpha_0 + \alpha_1 * tempo_i + \beta_{j_i} + \gamma_{k_i} + (\beta\gamma)_{jk_i}$$

Em que Y_{ijk} corresponde em cada observação em i -ésimo período de tempo, j -ésimo tratamento e k -ésimo tipo de inoculação; α_0 é a média geral; α_i é o efeito quantitativo tempo (30, 60, 90 e 120), β_j é o efeito tratamento (milho e soja); γ_k é o efeito tipo de inoculação a partir de $j = 1$ e 2 ; $(\beta\gamma)_{jk}$ é o efeito da interação entre tratamento e inoculação.

O modelo ZIP tem duas partes, um modelo de Poisson de contagem e o modelo *log* para prever o excesso de zeros. Assim, a distribuição de probabilidade do modelo de Poisson ZIP de uma variável aleatória Y é dada por:

$$\Pr(Y = y_{ijk}) = \pi + (1 - \pi)e^{-\lambda} \text{ for } y_{ijk} = 0$$

$$\Pr(Y = y_{ijk}) = (1 - \pi) \frac{\lambda^{y_{ijk}} e^{-\lambda}}{y_{ijk}!}, y_{ijk} > 0$$

Sendo o parâmetro π é chamado de probabilidade de zero-inflacionado, e é a probabilidade de contagens zero em excesso da frequência prevista pela distribuição de Poisson.

Os parâmetros do modelo ZIP para modelar as funções de ligação foram representados por π e λ , onde:

$$h(\pi_{ijk}) = z'_{ijk} \gamma$$

$$g(\lambda_{ijk}) = x'_{ijk} \beta$$

Sendo h a função de ligação *log* especificada do modelo zero de confirmação do GENMOD no SAS. Para a parte do modelo de Poisson, g foi a função de ligação *log* especificada no modelo de confirmação. As co-variáveis z_{ijk} e x_{ijk} foram determinadas pelo modelo zero e modelo de confirmação, respectivamente. Os parâmetros de regressão γ e β foram estimados por razão de verossimilhança.

Para avaliar e definir o modelo de melhor ajuste para variável penetração, os testes estatísticos utilizados foram os mesmos para mortalidade, conformemostrado anteriormente (Tabelas 2 e 3).

Para mortalidade e penetração de *P. brachyurus*, análise do tipo III foi realizada para avaliar a significância estatística dos efeitos principais e interação nos modelos. Além disso, para todos os efeitos estatisticamente significativos, contraste em procedimento GLIMMIX do SAS foi utilizado para comparar tratamentos, tipo de inoculação e efeitos de interação.

A análise exploratória para as variáveis respostas e de previsão foram avaliadas utilizando PROC MEANS no SAS. A interpretação consistiu na análise da média e variância para a mortalidade e penetração para todo o conjunto de dados e para cada variável de previsão categórica.

3. RESULTADOS

3.1 Nematoides remanescentes e infectividade

Estipulação de igualdade da média condicional e variância são esperadas na distribuição de Poisson. No entanto, no presente estudo, foi observado que a média e variância dos efeitos foram muito diferentes, além de um excesso de zeros para a penetração dos nematoides. A análise de razão de verossimilhança para o parâmetro de estimativa de zero-inflacionado da penetração mostrou que o parâmetro interceptão era significativo de acordo com o teste de Wald Chi-quadrado ($P > \chi^2 = 0,0003$; dados não mostrados), sugerindo que o modelo do zero-inflacionado poderia ser necessário para a modelagem da penetração de *P. brachyurus*. Portanto, o conjunto dos dados originais da penetração confirmou o excesso de zeros.

A análise tipo III do modelo BN para mortalidade de *P. brachyurus* indicou que os efeitos principais tratamento e tipo de inoculação, e sua interação foram estatisticamente significativos, a variável tempo foi não significativo. Para penetração, o modelo ZIP indicou que o tempo, tratamento, tipo de inoculação e o efeito da interação entre tratamento x tipo de inoculação foram estatisticamente significativos de acordo com o teste do Chi-quadrado (Tabela 4).

Tabela 4. Análise tipo III dos efeitos principais e interações do modelo linear generalizado para o conjunto de dados da mortalidade e penetração de *Pratylenchus brachyurus*.

Efeito	Mortalidade - Modelo BN		Penetração - Modelo ZIP	
	Valor Chi-quadrado	P > Chi-quadrado	Valor Chi-quadrado	P > Chi-quadrado
Tratamento	10,75	<.0001	336,1	<.0001
Tipo (inoculação)	107,71	<.0001	4007,77	<.0001
Tempo (dias)	0,200	0,6525	2112,89	<.0001
Tratamento*tipo	80,36	<.0001	156,21	<.0001

Para efeito de interação, as estimativas de contraste mostraram a significância estatística da diferença entre controle com milho e soja dentro de cada método de inoculação para a mortalidade de *P. brachyurus*. Quando milho ou soja foram inoculados através do

método de suspensão houve maior mortalidade de *P. brachyurus* (-0,0662; Tabela 5; Figura 1B) do que o método das raízes infectadas (-0,3632; Tabela 5; Figura 1B). A diferença estimada entre milho e soja para cada método de inoculação não apresentou diferenças estatísticas (Tabela 5; Figura 1A).

Tabela 5. Diferenças estimadas através do método da média dos mínimos quadrados (LSM) para mortalidade e penetração de *Pratylenchus brachyurus*.

Contrastes	Estimativa	StdErro	GL	Pr>t
Controle vs (Milho/Soja)/Suspensão	-0.0662	0.0202	137	0.0013
Controle vs (Milho/Soja)/Raízes infectadas	-0.3632	0.0203	137	<.0001
Milho vs Soja/Suspensão	0.0016	0.0233	137	0.9463
Milho vs Soja/Raízes infectadas	0.0163	0.0233	137	0.4864

Portanto, para os espécimes capazes de penetrar as raízes de milho e soja mesmo após longo período de armazenamento, a simples diferença da média dos mínimos quadrados mostrou que o milho inoculado através das raízes infectadas resultou em uma maior penetração de *P. brachyurus* do que aqueles inoculados com o método de suspensão (efeito estimado = -1,2588; $P > 0,0001$; dados não mostrados). Ao longo do tempo, 30 a 120 dias o número de nematoides sobreviventes capazes de penetrarem nas raízes de milho e soja foram diminuindo com o período de armazenamento (Figura 2C). O número máximo de nematoides capazes de penetrar as raízes pelo método de inoculação por suspensão chegou a 76 e 216, no milho e na soja, respectivamente. Porém, os nematoides foram muito mais numerosos pelo método de inoculação por raízes infectadas, chegando a 395 e 939 nas raízes de milho e soja, respectivamente (Figura 2B).

Análise tipo III do modelo BN na mortalidade de *P. brachyurus* indicou que os efeitos principais e interações foram estatisticamente significativos, porém o tempo não foi significativo (Tabela 4).

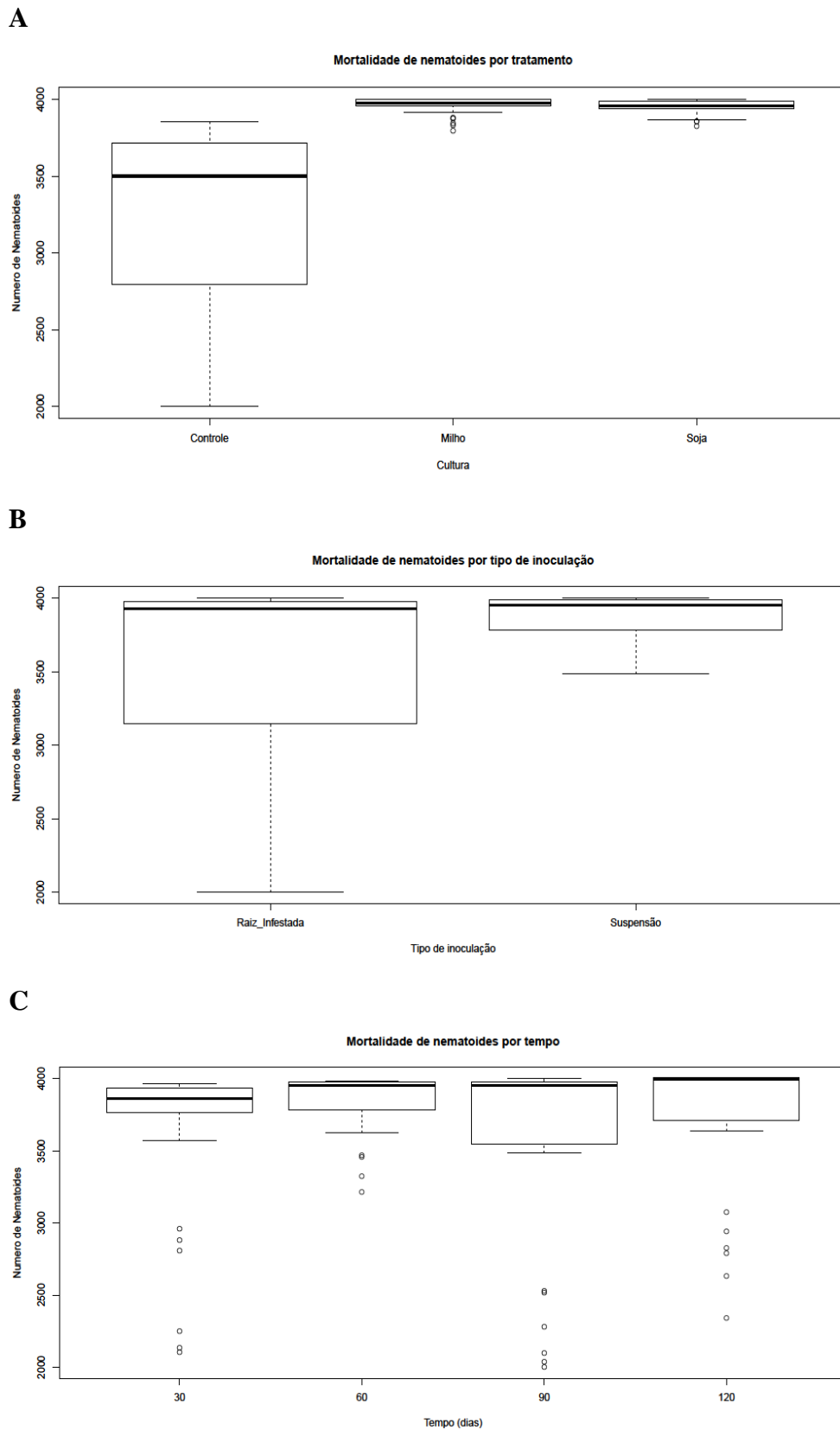


Figura 1. Gráfico box-plot para a mortalidade de espécimes de *P. brachyurus*. A- Mortalidade do nematoide por tratamento; B- Mortalidade do nematoide por tipo de inoculação; C- Mortalidade do nematoide durante o período de dessecação.

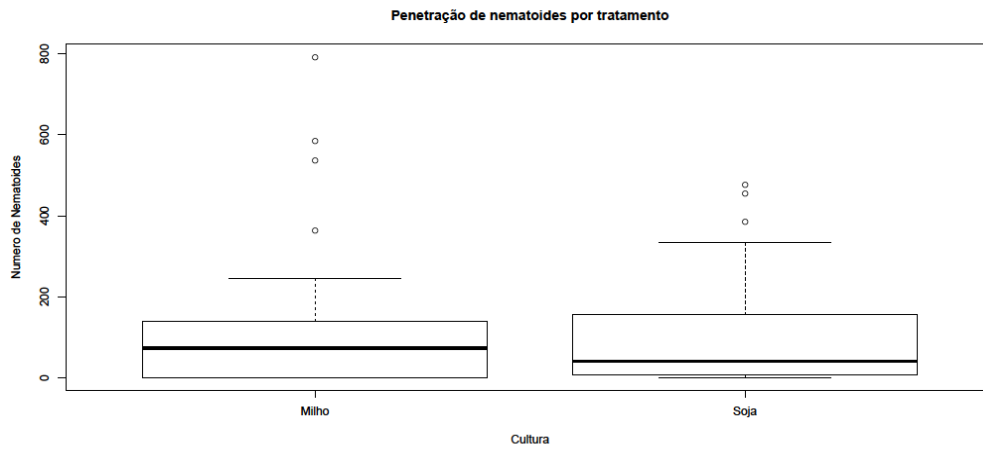
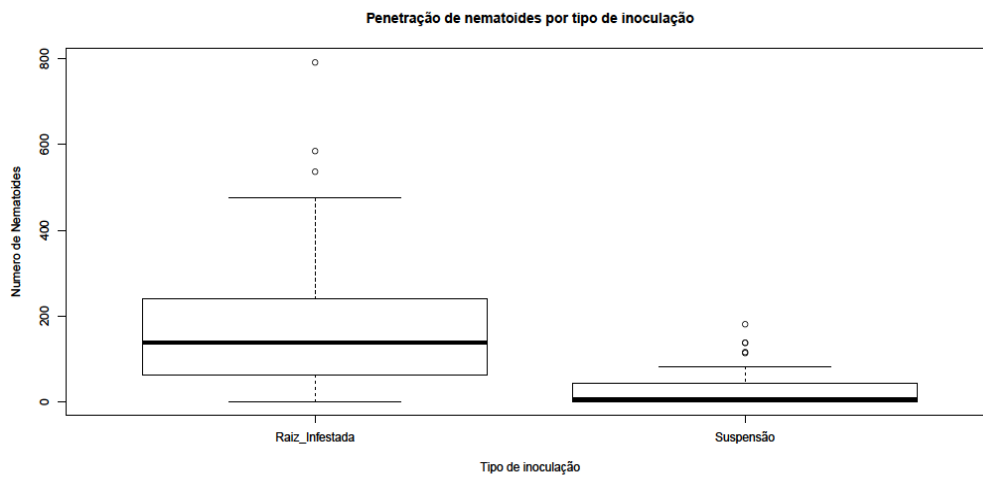
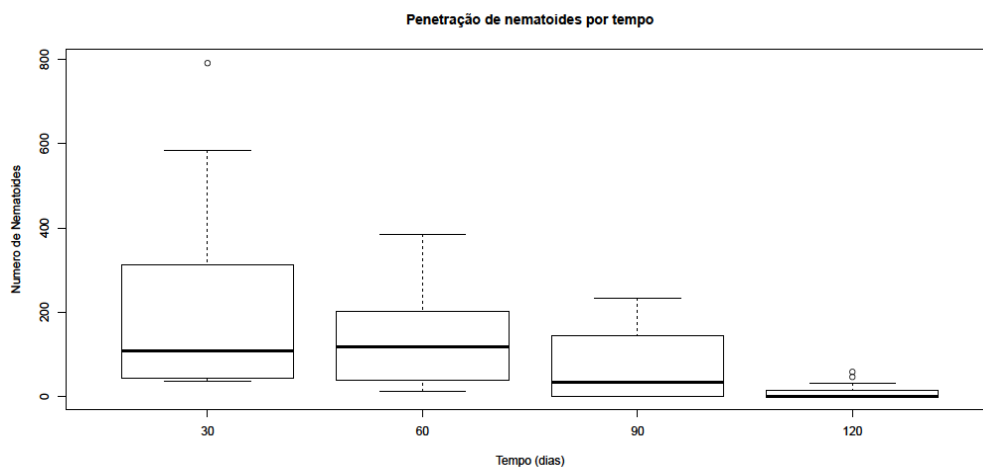
A**B****C**

Figura 2. Gráfico box-plot para a penetração de espécimes de *P. brachyurus*. A- Penetração do nematoide por tratamento; B- Penetração do nematoide por tipo de inoculação; C- Penetração do nematoide durante o período de dessecação.

3.2 Efeitos da dessecação

Os resultados mostraram o estado quiescente de juvenis de *P. brachyurus* extraídos do solo em inoculação aquosa e raízes infectadas incubadas durante 90 e 120 dias. A cutícula dos espécimes aparentou-se intacta após o longo período de incubação, mostrando uma postura de encolhimento, sugerindo estado anidrobiótico.

Nematoides mortos continham vacúolos em seus corpos, regiões tais como esôfago e intestinos não eram visíveis (Figura 3). Foram encontrados nematoides enrolados no solo, desidratados, mas com variações de formato. Alguns nematoides foram encontrados na forma de C aberto (Figura 3A e 3B) e C fechado (Figura 3E), outros totalmente enrolados (Figura 3C e 3D) ou com apenas a região posterior enrolada (Figura 3F).

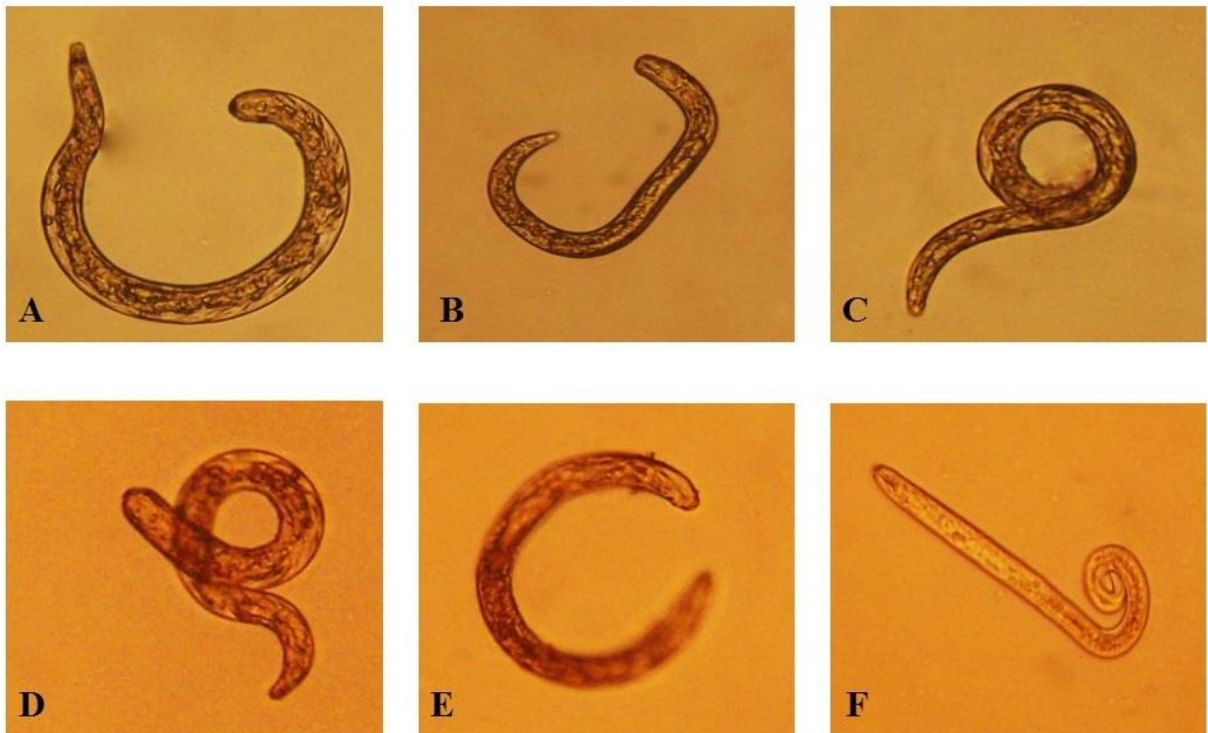


Figura 3. Formatos de juvenis de *P. brachyurus* extraídos a partir do solo dessecado aos 90 e 120 dias. A e B) C aberto; C e D) Enrolado; E) C fechado; F) Região posterior enrolada.

4. DISCUSSÃO

Dados de contagem, bem como de mortalidade e penetração de nematoides, comumente são representados por distribuições diferentes do que o normal (PAULA, 2013) e o modelo de regressão de Poisson é mais simples e padrão (CAMERON; TRIVEDI, 2013). No entanto, a presença de superdispersão na contagem dos nematoides para mortalidade justificou o uso da BN para controlar a equidispersão entre média e variância. O modelo utilizado para *P. brachyurus* confirma o resultado de Perez-Hernandez e Giesler (2014), o qual indicou que a mortalidade em *Heterodera glycines* é representada por uma distribuição BN.

Além disso, nossos resultados sugerem que o modelo inflacionado de zero poderia ser necessário para a modelagem da penetração de *P. brachyurus*. Considerando que, os dados da penetração apresentaram excesso de zeros, o modelo ZIP refletiu com precisão a superdispersão causada por uma preponderância de zeros. Além disso, o modelo ZIP tem duas partes, modelo de contagem de Poisson e o modelo *logit* para prever zeros excessivos (CAMERON; TRIVEDI, 2013). Por outro lado, estudos anteriores comumente transformam dados de contagem para normalizar os dados antes de realizar as análises estatísticas (CABASAN et al., 2012; FASKE, 2013). No entanto, essa transformação pode não representar a situação real sobre os zeros em excesso nos dados de penetração e textos estatísticos padrões raramente discutem esse problema. Ainda assim, só recentemente utilizou-se o modelo linear generalizado na modelagem de dados de contagem para acomodar o excesso de zeros (CAMERON; TRIVEDI, 2013).

A informação obtida neste estudo é a primeira avaliação da redução da densidade populacional do nematoide através dos diferentes métodos de inoculação (suspensão e raízes infectadas) durante o estresse da dessecação utilizando diferentes modelagens de análise estatística para melhor compreensão dos dados. Por conseguinte, a capacidade de *P. brachyurus* penetrar no milho e na soja após longo período de escassez de umidade ainda não havia sido investigada no Brasil.

O estudo demonstrou que a mortalidade do nematoide para os efeitos principais, tratamento e tipo de inoculação e sua interação, tratamento x tipo de inoculação foi significativa, em outras palavras, o solo cultivado com milho e soja apresentou maior número de indivíduos mortos em relação ao solo sem planta, independentemente do tipo de

inoculação. Com efeito, a presença das raízes pode ter contribuído para as diferenças na mortalidade, uma vez que os nematoides podem ter migrado em direção as raízes do hospedeiro, devido à fome, mostrando redução na população do solo cultivado com milho e soja.

O procedimento experimental é semelhante à dessecação que ocorre na natureza. Em um país de clima tropical como o Brasil, na entressafra, as temperaturas permanecem elevadas e a umidade do solo é quase zero nas camadas superficiais durante a estação seca. Nematoides parasitas de plantas necessitam das condições ambientais para controlar a perda de água, sendo dependentes de umidade no interior dos poros do solo e/ou da planta para inibir ou retardar esta perda (PERRY; MOENS, 2011). Sempre que a presença de plantas hospedeiras não é um fator limitante, a umidade tem maior influência sobre a densidade populacional do nematoide (ASMUS; ISHIMI, 2009).

Maior mortalidade foi devido à inoculação dos nematoides através do método de suspensão, em comparação com o método de fragmentos de raízes infectadas, que apresentou menor mortalidade. Anteriormente, Neves et al. (2012) observaram maior mortalidade de *P. brachyurus* aos 90 dias após inoculação na forma livre no solo, sem a presença de planta hospedeira. Isto ocorre porque os nematoides que vivem no interior das raízes das plantas são protegidos contra a dessecação antes da senescência das plantas. No entanto, os nematoides que não vivem dentro do hospedeiro são protegidos pela umidade do solo, mas estão sujeitos à rápida desidratação, enquanto há um aumento da temperatura e o solo perde umidade (McSORLEY, 2003).

Mesmo com os altos índices de mortalidade dos espécimes ao longo do tempo, a população que foi mantida após o período de escassez de umidade foi capaz de infectar as raízes do hospedeiro, embora tenha havido redução gradual da penetração no número de unidades experimentais ao longo do tempo, independentemente do tipo de inoculação. Isso prova que indivíduos de *P. brachyurus* permaneceram ativos ao invés de adotar um estado de sobrevivência, mantendo reservas alimentares, níveis de energia e motilidade, confirmando os resultados observados em *P. penetrans* (TOWNSHEND, 1984), *P. thornei* (TALAVERA et al., 1998) e *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, 1940 (TORRES et al., 2006).

O método de inoculação utilizado foi significativo na infectividade dos espécimes, isso confirma como indicado anteriormente, *P. brachyurus* sobreviveu dentro de fragmentos de raízes de soja possivelmente acumulando reservas dentro das raízes, fato confirmado por

Neves et al. (2012), comprovando que as raízes remanescentes no campo durante o período da entressafra servem como fonte de inóculo para a cultura seguinte.

Exemplares de *P. brachyurus* anidrobióticos foram obtidos a partir do solo sem planta em ambos os tipos de inoculação (suspensão e raízes), com espécimes mostrando-se morfológicamente semelhantes a outros parasitas de plantas encontrados em anidrobiose (GLAZER; ORION, 1983; TOWSON; APT, 1983; TOWNSHEND, 1984; OTSUBO et al., 2006; TSAI, 2008), sugerindo que o enrolamento é a forma geral de proteção contra a dessecação. A maioria dos nematoides podem apresentar estado quiescente em algum momento do ciclo de vida, mas relativamente poucas espécies são capazes de entrar em anidrobiose (McSORLEY, 2003). O baixo número de nematoides recuperados em anidrobiose, possivelmente pelo fato do solo já encontrar-se desidratado, ocorrendo rápida desidratação dos espécimes, também foi observado por Townshend (1984) para *P. penetrans* em solos secos rapidamente.

A ausência de reserva dentro do nematoide indicou uma redução no metabolismo durante a anidrobiose, semelhante às condições encontrada por Glazer e Orion (1983). Além disso, o longo período seco resultou em aumento de atividade da população na ausência de um hospedeiro, gastando suas reservas (TALAVERA et al., 1998) e a perda de água ao longo do tempo atingiu níveis letais para os nematoides.

A sobrevivência após a dessecação foi correlacionada com enrolamento, embora Otsubo et al. (2006) observaram espécimes de *Aphelenchus avenae* enrolados e não enrolados quando expostos ao estresse osmótico em ágar-sacarose, inferindo que a supressão da motilidade causada por estresse osmótico pode ser um prelúdio necessário para as mudanças fisiológicas que acompanham o estresse osmótico e facilita a anidrobiose, levando a considerar que a manutenção do “enrolamento” não é criticamente importante para a sobrevivência à dessecação, uma vez que as alterações bioquímicas são requisito para a manutenção do estado de anidrobiose (OTSUBO et al., 2006).

5. CONCLUSÃO

- a) A mortalidade de *P. brachyurus* foi influenciada pela presença de tecidos das plantas hospedeiras milho e soja.
- b) *Pratylenchus brachyurus* foi capaz de infectar as raízes de plantas de milho e soja após o período de escassez de alimento e umidade.
- c) Estes resultados suportam a interpretação de que *Pratylenchus brachyurus* pode resistir à dessecação, possivelmente em estado ametabólico.

6. REFERÊNCIAS

- ASMUS, G. L.; ISHIMI, C. M. Flutuação populacional de *Rotylenchulus reniformis* em solo cultivado com algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p.51-57, 2009.
- CABASAN, M. T. N; KUMAR, A; De WAELE, D. Comparison of migration, penetration, development and reproduction of *Meloidogyne graminicola* on susceptible and resistant rice genotypes. **Nematology**, v. 14, p. 405-415, 2012.
- CAMERON, A. C.; TRIVEDI, P. K. **Regression analysis of count data**. 2nd ed. Cambridge University Press. New York, NY. 2013. 566 p.
- COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. State Agricultural Research Center. 1972. 77 p.
- CROWE, L. M. Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 131, p. 505-513, 2002.
- DIAS-ARIEIRA, C. R.; MARINI, P. M.; FONTANA, L. F.; ROLDI, M.; SILVA, T. R. B. Effect of *Azospirillum brasilense*, Stimulate® and potassium phosphite to control *Pratylenchus brachyurus* in soybean and maize. **Nematropica**, v. 42, p. 170-175, 2012.
- ERKUT, C.; KURZCHALIA, T. V. The *C. elegans* dauer larva as a paradigm to study metabolic suppression and desiccation tolerance. **Planta**, v. 242, p. 389-396, 2015.
- EVANS, A. A. F.; PERRY, R. N. Survival strategies in nematodes. In: CROLL, N. A. (ed.). **Organization of Nematodes**. London, New York: Academic Press, p. 383-424, 1976.
- FASKE, T. R. Penetration, post-penetration development, and reproduction of *Meloidogyne incognita* on *Cucumis melo* var. *texanus*. **Journal of Nematology**, v. 45, p. 58-65, 2013.
- FELDMESSER, J.; FEDER, W. A.; REBOIS, R. V.; HUTCHINS, P. C. Longevity of *Radopholus similis* and *Pratylenchus brachyurus* in fallow soil in the greenhouse. **Anatomical Record**, v. 137, p. 355, 1960.
- GHINI, R. **Desinfestação do solo com o uso de energia solar: solarização e coletor solar**. Jaguariúna: Embrapa – CNPDA, 29 p. Circular Técnica 1. 1997.
- GLAZER, I.; ORION, D. Studies on anhydrobiosis of *Pratylenchus thornei*. **Journal of Nematology**, v. 15, p. 333-338, 1983.

GURMU, S.; TRIVEDI, P. K. Excess zeros in count models for recreational trips. **Journal of Business & Economic Statistics**, v. 14, p. 469-477, 1997.

INOMOTO, M. M. Importância e manejo de *Pratylenchus brachyurus*. **Revista Plantio Direto**, v. 108, p. 4-9, 2008.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, v. 48, p. 692, 1964.

JONES, M. G. K.; FOSU-NYARKO, J. Molecular biology of root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) and their interaction with host plants. **Annals of Applied Biology**, v. 164, p.163-181, 2014.

KEILIN, D. The Leeuwenhoek Lecture: The problem of anabiosis or latent life: History and current concept. **Proceedings of the Royal Society London**, v. 150, p.149-191, 1959.

MANI, A. Survival of the root-lesion nematode *Pratylenchus jordanensis* Hashimin a fallow field after harvest of alfalfa. **Nematology**, v. 1, p. 79-84, 1999.

McCULLAGH, P.; NELDER, J. A. **Generalized Linear Models**. 2nd Edition. London: Chapman and Hall, 1989.

McSORLEY, R. Adaptations of nematodes to environmental extremes. **Florida Entomologist**, v. 86, p. 138-142, 2003.

NEVES, D. L.; RIBEIRO, L. M.; DIAS-ARIEIRA, C. R.; CAMPOS, H. D.; RIBEIRO, G. C. Sobrevivência de *Pratylenchus brachyurus* em diferentes substratos, com baixo teor de umidade. **Nematropica**, v. 42, p. 211-217, 2012.

OTSUBO, R.; YOSHIGA, T.; KONDO, E.; ISHIBASHI, N. Coiling is not essential to anhydrobiosis by *Aphelenchus avenae* on agar amended with sucrose. **Journal of Nematology**. v. 38, p. 41-45, 2006.

PAULA, G. A. **Modelos de regressão com apoio computacional**. Instituto de Matemática e Estatística. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil. 2013.

PEREZ-HERNANDEZ, O.; GIESLER, L. J. Quantitative relationship of soil texture with the observed population density reduction of *Heterodera glycines* after annual corn rotation in Nebraska. **Journal of Nematology**, v. 46, p. 90-100, 2014.

PERRY, R. N.; MOENS, M. Survival of parasitic nematodes outside the host. In: PERRY, R. N.; WHARTON, D. A. (ed.). **Molecular and physiological basis of nematode survival**. Wallingford, UK: CAB International, p. 1-27, 2011.

TALAVERA, M.; VALOR, H.; TOBAR, A. Post-anhydrobiotic viability of *Pratylenchus thornei* and *Merlinius brevidens*. **Phytoparasitica**, v.26, p. 293-299, 1998.

TORRES, G. R. C.; PEDROSA, E. M. R.; MOURA, R. M. Sobrevivência de *Rotylenchulus reniformis* em solo naturalmente infestado submetido a diferentes períodos de armazenamento. **Fitopatologia brasileira**, v. 31, p. 203-206, 2006.

TOWNSHEND, J. L. Anhydrobiosis in *Pratylenchus penetrans*. **Journal of Nematology**, v. 16, p. 282-289, 1984.

TOWSON, A. J.; APT, W. J. Effect of soil water potential on survival of *Meloidogyne javanica* in fallow soil. **Journal of Nematology**, v. 15, p. 110-115, 1983.

TREONIS, A. M.; WALL, D. H. Soil nematodes and desiccation survival in the extreme arid environment of the Antarctic dry valleys. **Integrative and comparative biology**, v. 45, p. 741-750, 2005.

TSAI, B. Y. 2008. Anhydrobiosis of *Pratylenchus coffeae*. **Plant Pathology Bulletin**, v. 17, p. 17-24, 2008.

VUONG Q. H. Likelihood ratio tests for model selection and non-nested hypotheses. **Econometrica**, v. 57, p. 307-333, 1989.

WANG, Y.; EZEMADUKA, A. N.; TANG, Y.; CHANG, Z. Understanding the mechanism of the dormant dauer formation of *C. elegans*: From Genetics to Biochemistry. **IUBMB Life**, v. 61, p. 607-612, 2009.

WATANABE, M. Anhydrobiosis in invertebrates. **Applied Entomology and Zoology**, v. 41, p. 15-31, 2006.